DIE KOHLENHYDRATE EINIGER PILZE

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Julius-Maximilians-Universität
Würzburg.

Vorgelegt von
Dipl.Chem. Hans-Joachim Nebel
geboren zu Leipzig

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Würzburg 1955

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Febr. 55

DIE KOHLENHYDRATE EINIGER PILZE

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Julius-Maximilians-Universität
Würzburg.

Vorgelegt von
Dipl.Chem. Hans-Joachim Nebel
geboren zu Leipzig

Würzburg 1955

Berichterstatter: Prof. Dr. F. G. F i s c h e r

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Die vorliegende Arbeit wurde von 1954 bis 1955 im Chemischen Institut der Universität Würzburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. F.G. F i s c h e r ausgeführt.

Meinem verehrten Lehrer danke ich besonders für die vielen Anregungen und die großzügige Förderung.

Meinen Eltern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Allgemeiner Teil	2
I. Die Hydrolyse der Polysaccharide und die Bestimmung der Monosaccharide	2
1. Hydrolysen mit überkonz. Salzsäure und mit konz. Schwefelsäure	3
2. Aufarbeitung der Hydrolysate zur Chromatographie	4
3. Chromatographische Bestimmung der Hydrolysenprodukte	5
4. Verluste an Monosacchariden und Aufschluß von Polysacchariden unter den Hydrolysenbedingungen	5
II. Die Hydrolyse Hexosamin-haltiger Objekte und die Bestimmung der Aminohexosen	7
1. Hydrolyse Hexosamin-haltiger Objekte	7
2. Aufarbeitung der Hydrolysate zur Chromatographie	8
3. Bestimmung der Hexosamine	10
4. Chromatographische Hexosamin-Bestimmung im Vergleich zu der nach Elson und Morgan	14
5. Einige Beispiele chromatographischer Hexosamin-Bestimmung	14
III. Die Kohlenhydrate einiger Pilze	16
1. Das bisher Bekannte	16
2. Die Monosaccharide in den Pilzhydrolysaten	19
3. Diskussion der Ergebnisse	25
Zusammenfassung	33

Seite

Experimenteller Teil 37

A. Zur Bestimmung der neutralen Saccharide 37

I. Die Hydrolyse mit überkonz. Salzsäure bzw. konz. Schwefelsäure 37

II. Die Weiterverarbeitung der Hydrolysate und die Nachhydrolyse 38

III. Die restlose Entfernung der Säure 40

B. Zur Bestimmung der Aminozucker 42

I. Die Hydrolyse Hexosamin-haltiger Polysaccharide 42

II. Die Entfernung der Säure 43

III. Die präparative Herstellung von Glucosamin- und Galaktosamin-hydrochlorid 45

IV. Die Ausführung der Reaktion nach Elson und Morgan 45

C. Zur Chromatographie 46

I. Analysen- und Vergleichslösung 46

II. Die Entwicklung der Chromatogramme 46

III. Anfärben der Chromatogramme 49

IV. Die Auswertung der Chromatogramme 52

D. Zur Untersuchung der Kohlenhydrate einiger Pilze 53

I. Die Analysensubstanzen 53

II. Die Analyse der Pilzsubstanzen 53

Literaturverzeichnis 55

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543524_0106

Einleitung

Unsere Kenntnisse über die Verbreitung und die Mengenverhältnisse der einfachen Zucker und der Polysaccharide in der Natur sind sehr lückenhaft. Nur den häufigsten, auch mengenmäßig vorherrschenden und technisch wichtigsten Vertretern, Zellulose und Stärke, sind viele Tausende von Untersuchungen gewidmet worden. Der genauere Nachweis und die chemische Untersuchung von Pentosanen, Hexosanen, oder von Pektinstoffen und Gummen, von Chitin, von den besonderen Polysacchariden der Algen, Pilze und Bakterien, beschränkt sich jedoch auf eine relativ recht kleine Zahl von Beispielen, die immer wieder aus den gleichen Objekten gewonnen wurden (1 - 3). Oft, wie z.B. bei den meisten untersuchten Pilzen, ist der Nachweis einzelner Kohlenhydrat-Bestandteile nur durch mikrochemische Reaktionen erfolgt, die durchaus nicht immer eindeutig sind (2,3).

In jüngster Zeit gestatten die chromatographischen, insbesonders die papierchromatographischen Methoden exakte Trennungen und Identifizierungen von Mono- und Oligosacchariden auszuführen und zwar schon mit sehr kleinen Mengen und mit geringem Zeitaufwand (4).

Von F.G. Fischer und H. Dörfel (5) ist eine papierchromatographische Methode zur quantitativen Bestimmung reduzierender Zucker ausgearbeitet worden, die auch für Serienuntersuchungen sehr gut geeignet erscheint. Sie beruht auf der Reduktion von Triphenyltetrazoliumbase zum roten Formazan auf dem Papier und auf der Photometrierung der gebildeten Farbstoffmenge nach Extraktion aus dem Papierbogen.

Durch die Trennung und quantitative Bestimmung der reduzierenden Monosaccharide wird auch die Kennzeichnung und Bestimmung von Polysacchariden möglich, nähmlich nach ihrer Hydrolyse. Die Untersuchung des Objektes (Teil einer höheren Pflanze, Pilzmycel usw.) im unvorbehandelten Zustand und nach Extraktion mit Wasser, Säure und Lauge zeigt quantitativ an, welche Polysaccharide löslich und welche Zellmembran- bzw. unlösliche Skelettbestandteile sind.

In der vorliegenden Arbeit sollten die Kohlenhydrat-Bestandteile einiger Pilze (Basidiomyceten, Ascomyceten, Actinomyceten

quantitativ ermittelt und die erhaltenen Ergebnisse miteinander verglichen werden. Dazu war es zunächst notwendig, die Bedingungen zu ermitteln, unter denen eine möglichst vollständige Hydrolyse der in den Pilzen vorkommenden Polysaccharide bei geringster Zersetzung der Hydrolysenprodukte stattfindet. Weiterhin war es erforderlich, die Aufarbeitung der Hydrolysate zur Chromatographie so zu gestalten, daß nicht nur ein qualitativer Nachweis, sondern auch eine quantitative Bestimmung der gebildeten Monosaccharide möglich war.

Allgemeiner Teil

I. Die Hydrolyse der Polysaccharide und die Bestimmung der Monosaccharide

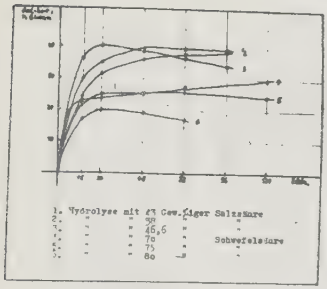
An den Beispielen der Zellulose und Stärke sind Hydrolysen mit verdünnten Säuren in der Hitze und mit konzentrierten Säuren in der Kälte von wissenschaftlicher und technischer Seite genauestens untersucht. Die gewonnenen Erfahrungen lehren, daß durch Hydrolysen in kalten konzentrierten Säuren (konz. Schwefelsäure oder überkonz. Salzsäure) mit folgender "Nachhydrolyse" der verdünnten Lösungen in der Hitze die Ausbeuten an Monosacchariden nahezu theoretisch sein können (6-9). Bereits 1819 erhielt Braconnot (8) durch eine in dieser Weise mit Schwefelsäure durchgeführte Hydrolyse von Zellulose nahezu theoretische Glucoseausbeuten. Es ist bekannt, daß bei Schwefelsäure-Behandlung der Polysaccharide Estersäuren von größeren Bruchstücken gebildet werden, welche die konzentrierte Säure nicht weiter angreift (6-9). Erst durch Kochen mit verdünnten Säuren (Nachhydrolyse) tritt weitere Spaltung in die Monosaccharide ein. Willstätter und Zechmeister gaben 1913 eine Hydrolysenmethode bekannt, nach der sie durch Behandlung mit überkonzentrierter Salzsäure ohne Nachhydrolyse Zellulose quantitativ in Glucose spalteten (9). Nach Angaben anderer Autoren genügt jedoch die Hydrolyse mit überkonz. Salzsäure allein nicht, um die Polysaccharide quantitativ zu spalten. H. Ost u.a. (6 - 1o) empfehlen nach der Hydrolyse von Zellulose mit überkonz. Salzsäure ein Erhitzen der verdünnten Lösung. Nach O. Ant-Wuorinen (11) treten bei alleiniger Hydrolyse mit überkonz. Salzsäure als Spaltstücke Di-, Tri- und höhere Saccharide

auf, die nach seinen Feststellungen nicht durch Rückpolymerisation entstanden sein können.

Zunächst glaubten wir, der von Willstätter und Zechmeister entdeckten Methode deshalb den Vorzug geben zu müssen, weil bereits durch Behandlung mit überkonz. Salzsäure allein eine weitgehende Spaltung der Polysaccharide erreicht wird und weil wir erwarteten, die leichtflüchtige Säure ohne Schwierigkeiten im Vacuum abtreiben zu können. Nach näherer Überprüfung stellte sich heraus, daß man mit Hilfe der Schwefelsäure-Hydrolyse einfacher und schneller als durch Salzsäure-Hydrolyse zu gleichen Analysenergebnissen gelangt.

1. Hydrolysen mit überkonz. Salzsäure und mit konz. Schwefelsäure

Nach Behandlung eines als Beispiel gewählten Objektes (Membransubstanz von Penicillium chrysogenum) mit Salz- bzw. Schwefelsäure verschiedener Konzentration (bei 20°), wurden die cuprometrisch ermittelten Reduktionswerte der Hydrolysate (s.S.37) in ein Diagramm als Funktion der Behandlungsdauer eingetragen.



Reduktionswerte nach Hydrolyse der Membransubst. von P. chrysogenum mit Salzsäure und Schwefelsäure verschiedener Konzentration nach verschiedenen Zeiten (bei 20°).

Wie aus dem Kurvenverlauf erkannt werden kann, ist in beiden Fällen eine 24 stdg. Hydrolysendauer mit 46,6 Gew.%iger Salz- bzw. 75 Gew.%iger Schwefelsäure bei 20° günstig. Durch längere Säurebehandlung treten merkliche Zerstörungen der gebildeten Monosaccharide auf. Niedere Temperatur verzögert die Hydrolyse, höhere Temperatur läßt die Säuren stark zerstörend wirken.

Die Reduktionswerte der mit den konz. Säuren erhaltenen Hydrolysate steigen durch Erhitzen der auf einen geringeren Säuregehalt (o,5n) verdünnten Lösung auf 100° weiter an (Nachhydrolyse) und erreichen nach 6-8 Stdn. übereinstimmende maximale Grenzwerte (z.B. Membransubst. von P. chrysogenum 45,6 % Glucan, Skelettsubst. von P. chrysogenum 71,3 % Glucan). Der Verlauf der

"Nachhydrolyse" wurde am Beispiel eines schwefelsauren Hydrolysates des Pilzes Craterellus cornucopioides mit Hilfe der quantitativen chromatographischen Analyse verfolgt. Durch Unterbrechung der Hydrolysen in bestimmten Zeitabständen mit nachfolgender Chromatographie stellten wir fest, daß nach 5-stdg. Erhitzen in 0,5n Säure auf 100° sämtliche Monosaccharide in maximaler Menge entstanden sind.

2. Aufarbeitung der Hydrolysate zur Chromatographie

Im Verlaufe unserer Untersuchungen erkannten wir, daß auch kleinere Konzentrationen von Säure im Hydrolysat die chromatographischen Bestimmungen stören, denn erstens wird nach dem Auftragen saurer Lösungen beim Eindunsten im Luftstrome des Öfen der Papier hydrolysiert, sodaß Zellobiose- und Glucoseflecken entstehen, und zweitens entstehen dabei Polyosen durch "Reversion" (10-16) aus den Monosacchariden, wie sich aus der Bildung starker Startflecken und durch chromatographisch ermittelte Monosaccharid-Verluste nach Auftragen salzsaurer Zuckerlösungen auf die Startstriche nachweisen läßt.

Es war daher notwendig, die Aufarbeitung der Hydrolysate für die quantitative Chromatographie so zu gestalten, daß ohne Minderung des maximalen Reduktionswertes die Säure restlos entfernt wurde, ferner suchten wir die Hydrolysate nur so weit zu verdünnen, daß jede einzelne Zuckerkomponente möglichst innerhalb der Grenzen von 0,2-0,5 % darin enthalten ist (5).

Es ist nicht möglich, die Salzsäure durch Eindampfen der Hydrolysate bis zur Trockene völlig zu entfernen, ohne daß dabei, auch wenn im Vacuum gearbeitet wird und höhere Temperaturen vermieden werden, "Reversion" der Monosaccharide eintritt. Die Entfernung des größten Teiles der Salzsäure und auch eine Erhöhung des ursprünglichen Reduktionswertes wird erreicht, wenn man nur bis auf ein kleines Volumen einengt (s.S. 5).

Die restlose Entfernung der Schwefel- bzw. Salzsäure wurde in verschiedener Weise zu erreichen versucht: während nach Neutralisation mit Alkali die entstandenen Salze eine Störung der Chromatographie bewirkten, bewährte sich zur Säureentfernung eine Anionenaustauscher-Säule. Am einfachsten ist es jedoch, die Säuren durch Zugabe der äquivalenten Mengen Calzium-bzw. Silberkarbonat zu neutralisieren. Durch einige Versuchsreihen

vergewisserten wir uns, daß dadurch keine Änderung der Monosaccharid-Konzentration in der Lösung eintritt. Nach erfolgter Nachhydrolyse brauchen die auf ein bestimmtes Volumen gebrachten Lösungen nur mit der berechneten Menge der Karbonate versetzt zu werden und sind dann fertig zur Chromatographie.

3. Chromatographische Bestimmung der Hydrolysenprodukte

Die chromatographische Bestimmung der Monosaccharide wurde nach (5) ausgeführt (s.S.46). Zur Identifizierung der einzelnen Komponenten diente eine"Voranalyse" der Hydrolysate, die auch eine erste Schätzung der Mengenverhältnisse gestattete. Als quantitative "Hauptanalyse" liefern Chromatogramme mit 4-12 Trennbahnen für Analysen- und angeglichene Vergleichslösung (Abstufung im Verhältnis 1 : 2) hinreichend genaue Werte (mittl.Fehler ± 2-3 %).

4. Verluste an Monosacchariden und Aufschluß von Polysacchariden unter den Hydrolysenbedingungen

Durch die Hydrolysen in der beschriebenen Ausführung treten a. unvermeidliche Verluste durch Zerstörung der Spaltprodukte auf, weiterhin wird b. möglicherweise nicht jedes Polysaccharid quantitativ aufgeschlossen.

Zu a.

Zur Bestimmung der zerstörenden Wirkung der Säuren unterwarfen wir ein Gemisch von Monosacchariden den Bedingungen der Hydrolysen. Die erhalten gebliebenen Monosaccharide wurden chromatographisch ermittelt.

Tab. 1 Verluste an Monosacchariden unter den Hydrolysenbedingungen in %. a. Bedingungen der Schwefelsäure-, b. Bedingungen der Salzsäure-Hydrolyse.

	a.	b.
Galaktose	5,1	5,3
Glucose	6,6	4,7
Mannose	6,4	4,5
Arabinose	1o,4	15,5
Ribose	11,1	-
Xylose	1o,1	14,7
Rhamnose	1o,9	-

Die Pentosen werden mehr angegriffen als die Hexosen. Mit diesen Verlusten wird man bei in dieser Art durchgeführten Hydrolysen maximal zu rechnen haben.

Zu b.

Nach Hydrolyse entfetteter Zellwolle konnten chromatographisch 92-95 % der Theorie an Glucose bestimmt werden. Berücksichtigt man die oben angegebene Zersetzung der Glucose, so ergibt sich, daß die Zellulose quantitativ aufgeschlossen wird.

Um festzustellen, ob die beiden Hydrolysen-Methoden mit Salz- und Schwefelsäure einander gleichwertige Aufschlüsse der Hexosane und Pentosane ergeben, wurden zwei als Beispiele gewählte Pilzsubstanzen hydrolysiert. Nach der chromatographischen Bestimmung der Monosaccharide ergaben sich die in Tab. 2 angeführten Werte.

Tab. 2 Vergleich der Monosaccharid-Ausbeuten (% Monosaccharid-anhydrid) nach Hydrolyse mit 75 Gew. %iger Schwefelsäure (a) und 46,6 Gew.%iger Salzsäure (b).

	a. Hydrolyse mit Schwefelsäure	b. Hydrolyse mit Salzsäure	Differenz in %
Membransubst. P. chrysogenum			
Galaktose	1,5	1,5	o
Glucose	34,8	34,4	-1,2
Mannose	3,9	4,o	+2,5
Craterellus cornucopiodes			
Glucose	15,2	15,9	-4,2
Mannose	4,2	4,2	o
Xylose	2,3	2,1	-8,6

Beide Hydrolysenmethoden führen zu nahezu gleichen Ergebnissen.

Aus der Literatur ist zu entnehmen (17), daß die aus neutralen Monosacchariden aufgebauten Hexosane und Pentosane durch Säurebehandlung in der Hitze schneller als die relativ schwer hydrolysierbare Zellulose in die Einfachzucker gespalten werden. Deshalb ist anzunehmen, daß auch sie unter den oben angeführten Hydrolysenbedingungen wie die Zellulose quantitativ hydrolysiert werden.

Dagegen wird das im Pilzreich weitverbreitete Chitin durch Hydrolysen in der angegebenen Art nur ungenügend hydrolysiert. Nach 4 stdg. Erhitzen mit 7n Salzsäure auf 100° entstand z.B. doppelt so viel Glucosamin als nach einer Hydrolyse mit überkonz. Salzsäure unter den oben angegebenen Bedingungen. Quantitative Bestimmungen über den Hexosamingehalt müssen deshalb mit Hydrolysaten durchgeführt werden, die unter anderen, schärferen Bedingungen erhalten wurden (18).

II. Die Hydrolyse Hexosamin-haltiger Objekte und die Bestimmung der Aminohexosen

1. Hydrolyse Hexosamin-haltiger Objekte

Zur Ermittlung der optimalen Hydrolysen-Bedingungen, unter denen Glucosamin aus Chitin freigelegt wird, wurden einige Versuchsreihen ausgeführt. Reines Chitin (aus Garnelenschalen in der üblichen Weise dargestellt, s.S. 45), mit 7n Salzsäure bei 100° hydrolysiert, gibt nach 4 Stdn. maximale Glucosamin-Ausbeuten.

Tab. 3 Hydrolyse von Chitin durch 7n Salzsäure bei 100°. Glucosamin-anhydrid in % der Einwaage. Mittelwerte aus je 6 Einzelbestimmungen.

2 Stdn. 70,4 / 4 Stdn. 71,2 / 6 Stdn. 70,4 / 8 Stdn. 67,1

Wesentlich für eine vollständige Hydrolyse ist jedoch, daß das chitinhaltige Objekt mit konz. Salzsäure in Lösung gebracht wird, bevor man die Säure auf 6- oder 7n verdünnt, denn in der verdünnten Säure löst sich Chitin selbst nach 15 stdg. Erhitzen auf 100° nur ungenügend auf.

In zahlreichen Analysen von Pilzen (s.S. 20) erwies es sich als hinreichend, nach Lösung der Substanz in konz. Salzsäure bei 50° 4 Stdn. mit 7n Salzsäure bei 100° zu hydrolysieren, um das Glucosamin vollständig freizulegen. Weitere Untersuchungen zeigten, daß nach derartigen Hydrolysen auch die Hexosamine von Knorpel, Mucin, Hyaluronsäure und Heparin in maximalen Mengen erhalten werden (s.S. 43). Insektenteile lassen sich schwieriger hydrolysieren, weil sie sich selbst durch mehr -

stündiges Erwärmen in konz. Salzsäure auf 5o° nur unvollständig lösen. Eine Extraktion der Lipoide zur besseren Benetzung der zu hydrolysierenden Substanz ist dann zu empfehlen.

Auch die präparative Darstellung von Glucosamin-hydrochlorid aus Chitin wird am besten mit 7n Salzsäure durch 4 stdg. Erhitzen auf 1oo° ausgeführt (s.S. 45).

Gegen heiße Mineralsäuren sind die beiden 2-Aminohexosen viel unempfindlicher als die neutralen Monosaccharide, aber keineswegs völlig beständig. Das auf G.Ledderhose (19) zurückgehende Verfahren zur präparativen Herstellung von Glucosamin-hydrochlorid durch wiederholte länger dauernde Behandlung von Chitin mit heißer konz.Salzsäure zerstört 2o-3o % der Aminohexose. Nach 2 stdg. Erhitzen von Glucosamin in konz.Salzsäure im Einschlußrohr sind 19 % zersetzt. Bei Verwendung verdünnterer Säure werden die Verluste geringer. Wir fanden, daß Glucosamin beim 4 stdg. Erhitzen in 7n Salzsäure auf 1oo° zu 5 % zerstört wird. Mit diesem Verlust wird man bei Hydrolysen unter den angegebenen Bedingungen maximal rechnen müssen.

2. Aufarbeitung der Hydrolysate zur Chromatographie

Ebenso wie nach dem Aufschluß von Polysacchariden mit konz. Schwefelsäure oder überkonz. Salzsäure müssen auch diese Hydrolysate vor ihrer Chromatographie entsäuert werden. Am einfachsten wäre es, die Salzsäure durch Eintrocknen der Hydrolysate im Exsiccator zu entfernen. Wir stellten fest, daß die Hexosamin-Werte vieler Hydrolysate dabei bis auf die Hälfte oder drei Viertel der tatsächlichen zurückgehen können. Salzsaure Glucosamin-Lösungen oder Hydrolysate von gereinigtem Chitin zeigen nach dem Eindampfen zur Trockene keine Verluste, auch nicht, wenn vorher Aminosäuren zugesetzt wurden. Dagegen erhielten wir sofort dann zu kleine Hexosamin-Werte, wenn Monosaccharide vor der Hydrolyse oder vor dem Eintrocknen beigemischt wurden. Vermutlich treten ähnliche "Reversions-Erscheinungen" ein, wie wir sie bereits beim Eintrocknen saurer Monosaccharidlösungen beobachtet haben (s.S. 4), indem Zuckerstoffe bzw. deren Zersetzungsprodukte mit den Hexosaminen reagieren.

Tab. 4 Verluste an Glucosamin beim Eintrocknen salzsaurer Hydrolysate. a. Hydrolysat im Exsiccator bei Raumtemp. zur Trockene gedampft, b. Salzsäure mit Silberkarbonat entfernt.

	Glucosamin-anhydrid in % der Einwaage		Differenz
	a	b	in %
1. Citin	7o,6	71,o	o,5
2. Tricholoma albobrunneum (Lamellen)	2,3 2,o	3,7 3,7	58 86
3. Cantharellus cibarius (Stiel)	1,4	3,8	63
4. Boletus edulis (Hut)	2,2	4,1	46
5. Lepiota procera (Stiel)	7,5	14,3	47
6. Chitin + Gemisch aus 18 Aminosäuren	69,o 7o,7	71,o 71,o	2 o,4
7. Chitin + Gemisch aus Glucose, Galaktose, Mannose, Xylose	68,3	7o,6	4
8. Glucosamin	99,8	99,2	o
9. Glucosamin + Gemisch aus Glucose, Galaktose, Mannose, Xylose	82,5	1oo	17

Die Ansätze 1-7 wurden 4 Stdn. bei 1oo° mit 7n HCl hydrolysiert. Die Ansätze 8 u.9 (eingewogen Glucosamin-hydrochlorid) wurden nicht erhitzt, sondern sofort nach dem Lösen entsprechend a und b aufgearbeitet. Das Aminosäuren-Gemisch in Ansatz 6 enthielt die Säuren in gleichmolaren Mengen, insgesamt mit dem dreifachen Gewicht des Chitins. Die 4 Monosen in den Ansätzen 7 u.9 lagen in gleichmolaren Mengen vor und wogen insgesamt das 3o fache des Chitins bzw. Glucosamins. Die Zahlen sind Mittelwerte aus je 3 Einzelbestimmungen.

Das Eindampfen der Hydrolysate zur Trockene ist also unzulässig, sobald außer den Hexosaminen noch, wie es ja meist der Fall ist, Kohlenhydrate vorliegen. Es kann daher die jüngst von Tracey (2o) angegebene Vorschrift nicht zu richtigen Werten führen. Der Autor dunstet die salzsauren Hydrolysate vor der Bestimmung der Hexosamine nach Elson und Morgan im Exsiccator zur Trockene ein. Aus von uns angestellten Versuchen geht hervor, daß die eintretenden Verluste zum Teil durch die zu hohen Werte der colorimetrischen Bestimmung (s. S.[illegible]) wettgemacht werden.

Tab. 5 Aus den Ansätzen Glucosamin + Monosaccharidgemisch nach der Behandlung entsprechend 1 und 2 bestimmtes Glucosamin: a. durch Chromatographie, b. nach Elson und Morgan. Angaben in % der Einwaage.

	a	b
1. in 7n HCl lösen und i.V. zur Trockene dampfen.	87,4	93,6
2. 4 Stdn. mit 7n HCl auf 100° und i.V. zur Trockene dampfen.	58,6	81,0

Die Monosaccharide: Galaktose, Glucose, Mannose und Xylose waren in gleichmolaren Verhältnissen, zusammen das 20 fache des Glucosamins.

Es ist hervorzuheben, daß das gemeinsame Erhitzen von Hexosaminen und neutralen Saccharidden in verdünnteren sauren Lösungen (unter den Hydrolysenbedingungen) keine Hexosamin-Verluste zur Folge hat. Es wäre sonst jede Aminozucker-Bestimmung von Kohlenhydrat-haltigen Stoffen von vornherein unrichtig.

Wie die Entsäuerung der mit überkonz. Salzsäure erhaltenen Hydrolysate von Polysacchariden (s.S. 4) wird die Salzsäure am zweckmäßigsten durch Zugabe der aus der verwendeten Säure berechneten Menge Silberkarbonat entfernt. Einige Versuchsreihen zeigen, daß dadurch keine Änderung der Hexosamin-Konzentration in der Lösung eintritt. Alle Beispiele (außer der in Tab 4 Spalte a und Tab.5) sind in dieser Weise entsäuert worden.

3. Bestimmung der Hexosamine

Bisher ist zur Erkennung und quantitativen Bestimmung der beiden 2-Aminohexosen fast ausschließlich ihre Farbreaktion nach Elson und Morgan (21) verwendet worden. Nach den Untersuchungen verschiedener Autoren (22), sowie nach unseren eigenen Erfahrungen liefert diese Reaktion jedoch in den meisten Fällen zu hohe Werte, die sogar bis zum Doppelten der wirklichen gehen können (23 - 27), auch in Abwesenheit der Hexosamine kann sie positiv ausfallen (28). Diese Erscheinung wird darauf zurückgeführt, daß auch andere Kohlenhydrate und Aminosäuren oder primäre Amine, sowie Pyrrol- oder Indol-Derivate mit

Acetylaceton und dem Ehrlich'schen Reagenz eine Rotfärbung geben. Solche störende Chromogene sind jedoch allgemein in den Hydrolysaten von Chitin- und Chondroitin-haltigen Geweben, von Mucopolysacchariden oder von anderen Hexosamin-haltigen Präparaten enthalten. Glucosamin und Galaktosamin (Chondrosamin) können durch diese Farbreaktion nicht voneinander unterschieden werden, da sie beide Zucker in gleicher Weise geben.

Als Trennverfahren ist die Chromatographie der N 2,4-Dinitrophenyl-Derivate in der Zellulosesäule beschrieben (29). Durch fraktionierte Elution der Hexosamin-hydrochloride aus einer Kationenaustauscher-Säule (Dowex 5o) (3o) oder aus einer Zeocarb 225-Säule (31) wurden in jüngster Zeit quantitative Ergebnisse erhalten. Papierchromatographische Trennungsmethoden zum qualitativen Nachweis der Aminozucker werden von Masamune und Mitarbeitern angegeben (32). Wir fanden jedoch keines der von ihnen angegebenen Lösungsmittelgemische geeignet, um auf dem Papier eine für die quantitative Bestimmung genügend scharfe Trennung der beiden Hexosamine durchzuführen. Der Nachweis der Aminozucker auf den Papierchromatogrammen bzw. ihre Bestimmung in den Eluat-Fraktionen wurde in den angeführten Arbeiten stets nach Elson und Morgan ausgeführt.

Wir fanden nach zahlreichen Versuchsreihen, daß mit dem Lösungsmittelgemisch Pyridin-Essigester-Wasser-Eisessig 5:5:3:1 (v/v) eine scharfe Scheidung von Glucosamin und Galaktosamin voneinander und auch von anderen Sacchariden und Aminosäuren auf dem Papierbogen erreicht wird. Wenn wie üblich 2 cm breite Startstriche gewählt wurden, haben die Flecken eine Ausdehnung von nur etwa 4 cm^2.

Tab. 6 Laufstrecken der beiden 2-Aminohexosen, der Uronsäuren und einiger Aminosäuren mit dem Trenngemisch Pyridin-Essigester-Wasser-Eisessig 5:5:3:1$_o$ (v/v) im Durchlaufchromatogramm nach 48 Stdn. bei 2o°. Zur Dampfsättigung im Kastenboden: Pyridin-Essigester-Wasser 11:4o:6 (v/v).

D-Galakturonsäure	6,5 cm	D-Galaktosamin	12,5 cm
D-Glucuronsäure	8,8 "	D-Glucosamin	14,5 "
D-Mannuronsäure	11,o "	L-Valin	18,o "
L-Alanin, L-Threonin und L-Prolin	1o,o "		

Dadurch wird nicht nur die sichere Identifizierung, sondern auch die quantitative Bestimmung der beiden Aminohexosen ermöglicht.

Die Reaktion der Hexosamine mit Ninhydrin bzw. die Reduktion von Triphenyltetrazoliumbase zum roten Formazan läßt sich auf dem Papier zur exakten quantitativen Methode gestalten (5, 63b). Die Extinktionen des von gleichen Hexosamin-Mengen gebildeten Formazans sind etwa 2-2½ mal größer als die des Kupferkomplexes der Ninhydrinfärbung. Der Anstieg der Extinktionen (tg) der Farblösung bei steigenden Hexosamin-Mengen (5-20 µg) beträgt bei der Ninhydrinreaktion vom Glucosamin nur 40 %, vom Galaktosamin nur 33 % von dem der Formazan-Bildung. Die mittleren Streuungen der erhaltenen Werte durch Formazan-Bildung betragen 1-3 %, die durch Ninhydrinreaktion 2-4 %.

Trotz ihrer geringeren Empfindlichkeit glaubten wir zu Anfang unserer Untersuchungen der Ninhydrinmethode den Vorzug geben zu müssen. Denn die Farbentwicklung mit Triphenyltetrazoliumbase hat im Vergleich zu jener mit Ninhydrin den großen Nachteil der stärkeren Abhängigkeit von der Temperatur und der unvermeidlichen, relativ hohen "Papierleerwerte".

Im weiteren Verlauf der Arbeit fanden wir bei der Bestimmung von Chitin in Pilzen, daß die durch Ninhydrin-Entwicklung der Chromatogramme bestimmten Glucosamin-Werte höher waren (bis zu 25 %), als die durch Formazan-Bildung erhaltenen. Sobald jedoch proteinfreie Objekte untersucht wurden (gereinigtes Chitin oder durch Extraktion mit Natronlauge erhaltene Skelettsubstanzen von Pilzen), lieferten unter gleichen Versuchsbedingungen hergestellte Hydrolysate nach beiden Methoden übereinstimmende Ergebnisse (s.S. 51).

Die zur Freilegung der Hexosamine aus chitinhaltigem Material, Knorpel, Mucoproteiden usw. optimale Hydrolyse (4 Stdn. mit 7n HCl bei 100°) spaltet Proteine, zumal Skleroproteine, nicht vollständig. Es ist leicht möglich, daß die im Hydrolysat noch vorhandenen Peptide nicht restlos von den Aminohexosen getrennt werden und somit durch Anfärbung mit Ninhydrin die zu hohen Werte entstehen. Von den natürlich vorkommenden Aminosäuren trennt dagegen in 24 Stdn. das angegebene Lösungsmittelgemisch

die beiden Hexosamine vollständig. Die Aminozucker kommen in die breite Lücke zu stehen, die sich zwischen dem langsamer wandernden Alanin, Threonin, Prolin und dem schneller wandernden Valin ausbildet (Tab. 6).

Formazan-bildende Stoffe, die mit den Hexosaminen interferieren könnten, sind in den Hydrolysaten nicht enthalten, auch nicht bei Untersuchung Eiweiß- und Polysaccharid-haltiger Objekte. Die Uronsäuren werden völlig zerstört, neutrale Di- und Oligosaccharide sowie Diuronide vollständig hydrolysiert. Mehrere Versuchsreihen zeigten, daß sich die Glucosamin-Werte von Hydrolysaten aus reinem Chitin nicht änderten, wenn man dem Chitin vor der Hydrolyse Protein-, Polysaccharid- oder Polyuronsäure-haltige Stoffe zusetzte (bis zur 2o fachen Menge) Als Beispiel seien die Ergebnisse einiger Hydrolysen nach Zugabe wechselnder Mengen von Lamellen eines Pilzes (Tricholoma albobrunneum) und von drei Monosacchariden angegeben (Tab.7)

Tab. 7 Hydrolyse von Chitin in Anwesenheit anderer Stoffe. 4 Stdn. bei 1oo° mit 7n HCl hydrolysiert. Formazan-Entwicklung. Mittelwerte aus 6-12 Einzelwerten.

	Glucosamin-anhydrid in % der Einwaage	
	gefunden	berechnet
1. gereinigtes Chitin (aus Garnelen)	71,o	-
2. Tricholoma albobrunneum (Lamellen)	3,7	-
3. Chitin + Lamellen von T.albobrunneum (Gew.-Verhältnis 1:5 bis 1:2o, Mittel aus 4 Versuchsreihen	1o,7	1o,7
4. gereinigtes Chitin + Galaktose, Glucose und Xylose (Gew.-Verhältnis 1:1)	7o,8	71,o

Die Bestimmung der Hexosamine nach papierchromatographischer Trennung durch Formazan-Bildung ist also auch in Anwesenheit großer Mengen anderer Stoffe durchaus zuverlässig. Sie wurde deshalb bei allen in dieser Arbeit angegebenen Analysen angewendet.

Zur Bestimmung der Summe beider Hexosamine oder falls nur ein Hexosamin vorhanden ist, führt man zweckmäßig eine "Kurzstrecken-Chromatographie" durch. Nach 3-4 stdg. Entwicklung mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch wandern die Hexosamine nur 2-3 cm weit und bleiben als scharf umrissene Flecken eng zusammen. Die mittlere Streuung beträgt dann nur etwa 1 % (s.S. 48).

4. Chromatographische Hexosamin-Bestimmung im Vergleich zu der nach Elson und Morgan

Mit Hilfe der papierchromatographischen Trennung und der Formazan-Entwicklung konnten wir unschwer feststellen, daß die Farbreaktion nach Elson und Morgan bei Untersuchungen von z.B. Hydrolysaten von Pilzen oder Insektenteilen viel zu hohe Werte gibt. Deshalb ist die chromatographische Hexosamin-Bestimmung unbedingt der nach Elson und Morgan vorzuziehen. Die in Tab. 8 angegebenen Differenzen verminderten sich nicht bei einer Verlängerung der Hydrolysendauer auf 8,5 Stdn.

Tab.8 Papierchromatographische Glucosamin-Bestimmungen (a) im Vergleich zu solchen nach Elson und Morgan (2o) (b). (Hydrolysen mit 7n HCl, 4 Stdn. bei 1oo°. Formazan-Entwicklung. Mittelwerte aus 4-6 Einzelwerten).

	Glucosamin-anhydrid in % der Einwaage		Differenz
	a	b	in %
Hygrophorus eburneus (Stiel)	4,5	4,9	9
Tricholoma albobrunneum (Lamellen)	3,7	4,2	11
Lycoperdon gemmatum	1o,o	11,4	14
Calliphora erythrocephala (mit Aceton entfettet)	4,9	8,o	63

5. Einige Beispiele chromatographischer Hexosamin-Bestimmung

In Tab. 9 werden einige weitere Beispiele der von uns ausgeführten chromatographischen Hexosamin-Bestimmungen angegeben. Die Analysenwerte der untersuchten Pilz-Substanzen finden sich in Tab. 1o. Aus allen untersuchten Beispielen geht die Zuver -

lässigkeit der chromatographischen Aminozucker-Bestimmungs - methode hervor. Sie ist ohne Zweifel die erste allgemein anwendbare Methode zur individuellen Bestimmung der weitverbreiteten Hexosamine.

Tab. 3 Glucosamin- und Galaktosamin-Gehalt einiger Substanzen. a. Glucosamin-anhydrid, b. Galaktosamin-anhydrid in % der Einwaage. (Formazan-Entwicklung. Mittelwerte aus je 6 Einzelbestimmungen.) Die unter 6 und 8 angegebenen Werte wurden jeweils aus verschiedenen Hydrolysaten erhalten.

		a	b
1.	Heparin	2o,4	o
2a.	Hyaluronsäure	15,1	5,5
2b.	"	21,4	3,2
3.	Mucin	1o,9	6,1
4.	Nabelschnur	2,o	o,8
5.	Knorpel	1,o	8,3
6.	Puppenhäute von Ephestia kühniella		
	he-Stamm	16,8 16,7 16,7	o
	t-Stamm	17,7 18,1 18,3	o
7.	Puppenhäute von Calliphora erythrocephala	28,2	o
8.	Bugula avicularia (Bryozoa cheilostomata)	1,5 1,5 1,5 1,6	o

Präparat 1. verdanken wir der Deutschen Hoffmann-La Roche AG, Grenzach. 2a. Handelspräparat der General Biochemicals Ing., Chagrin Falls, USA. 2b. aus menschlichen Nabelschnüren hergestellt. 3. aus der Schleimhaut des Schweinemagens. 4. vom Menschen, mit Aceton entfettet. 5. von der Luftröhre des Rindes. 6. von Herrn Prof.A.Kühn, Max Plank-Institut für Biologie, Tübingen, zur Verfügung gestellt, mit Benzol-Alkohol wachsfrei extrahiert (Gew.-Verlust 21,5 %). 8. Von Doz.Dr.D.Schneider, daselbst, zur Verfügung gestellt (42,8 % Asche). 7. unvorbehandel

III. Die Kohlenhydrate einiger Pilze

1. Das bisher Bekannte

In früheren Arbeiten sind im Wesentlichen nur einige Kohlenhydrat-Bestandteile der Pilze untersucht worden, die sich durch Wasser, Säure oder Lauge extrahieren lassen oder durch mikrochemische Farbreaktionen jene, die ungelöst zurückbleiben.

Wasser- und laugelösliche Polysaccharide

Es sind mehrere wasser- und laugelösliche Pilz-G l u c a n e bekannt. Voneinander unterschieden werden sie meistens durch ihre mikrochemische Farbreaktion mit Jodlösung. Das von Dox und Niedrig 1914 (33) durch Extraktion von Penicillium expansum und Aspergillus niger mit heißem Wasser erhaltene und "Mycodextran" genannte Glucan gibt z.B. keine Reaktion mit Jod. Es wurde erkannt, daß es durch Amylase nicht abgebaut wird und sich mit zunehmenden Alter im Mycel anreichert. Glucane, die ebenfalls keine Reaktion mit Jod geben, ähnliche Löslichkeit aber eine andere optische Drehung wie die des "Mycodextrans" besitzen, wurden von Bilkinshaw et al. 1931 ([illegible]), May und Ward 1935 (35) und Albericci 1943 (36) aus verschiedenen Penicillia erhalten.

Das dem tierischen Glycogen ähnliche "Pilzglycogen" wurde zuerst von Errera 1885 beschrieben (37,38) und in zahlreichen Basidiomyceten durch seine rotbraune Anfärbbarkeit mit Jod - lösung nachgewiesen. In neuerer Zeit isolierte Ergle 1947 Glycogen aus Phymatotrichum omnivorum und fand es in seinen chemischen und physikalischen Eigenschaften identisch mit tierischem Glycogen (39). Nach seinen Ausführungen liegt es in zwei verschiedenen Zuständen vor, von denen die eine in heißem Wasser, die andere erst in Lauge löslich ist.

Glucane, die mit Jodlösung blau angefärbt werden, extrahierten bereits 1891 Bourquelot aus Boletus pachypus (40, 38,.) und 1894 Cramer aus den Sporen von Penicillium glaucum (41, 42) mit heißem Wasser und nannten sie "Stärke". In späteren Arbeiten wiesen Chrzaszcz und Tiukow 1929 (43) sowie Hida 1934 (44, 42) durch mikrochemische Farbreaktion "Stärke" in zahlreichen Penicillia nach. Wie die Stärke der höheren Pflanzen wird die "Stärke" der Pilze durch Diastase hydrolysiert.

Die mit basischen Farbstoffen anfärbbare "Callose" wurde in einigen Pernosporaceae und Saprolegnaceae sowie in verschiedenen Asco- und Basidiomyceten gefunden. Sie ist ein mit Phosphorsäure verestertes Glucan, ist schwerlöslich in Wasser und verdünnter Säure, löst sich dagegen leicht in Alkali (42).

Außer Glucanen kennt man seit den Arbeiten von Voswinkel an Mutterkorn 1891 (45, 38) (s.a. Ulander und Tollens 1906 an Bulgaria inquinans (46, 38), Dox und Niedrig 1914 an Aspergillus niger (33)) in heißem Wasser lösliche Pilzhexosane, die nach ihrer Hydrolyse vorwiegend Galaktose bzw. Mannose liefern, also Galaktane bzw. Mannane sind. Mit Jodlösung geben diese Polysaccharide keine Anfärbung. Clutterbuck (47) und Haworth (48) untersuchten (1934 - 1937) die Galaktane bzw. Mannane von Penicillium rugulosum und Penicillium charlesii. Es zeigte sich, daß die aus P. charlesii isolierte "Galaktocarolose" aus 9 - 10 Galaktoseeinheiten, die 1,5 ß-glucosidisch verbunden sind, aufgebaut ist. Die aus dem gleichen Pilz extrahierte "Mannocarolose" besteht aus 8-9 Mannoseeinheiten, die 1,6 verkettet sind. Nach der 1941 erschienenen Arbeit von Haworth (49) besteht Hefemannan aus 200-300 Mannoseeinheiten, die 1,2 1,3 und auch 1,6 verknüpft sind.

Pilz-Pentosane sind bisher kaum bearbeitet worden. Bereits 1891 erkannte Voswinkel (45, 38) in verschiedenen Basidiomyceten "Xylane", die nach ihrer Hydrolyse Saccharide mit Pentose-Reaktionen lieferten. Sie waren in Wasser schwer, in Alkalien dagegen leicht löslich. Dox und Niedrig (33) fanden 1911 in je drei Aspergilli/und Penicillia 0,8-1,2 % Pentosan (als Furfurol bestimmt).

Wasser- und laugeunlösliche Polysaccharide

Bereits 1811 wird von Braconnot ein Stoff "Fungin" beschrieben, der nach Alkali-Behandlung von Hutpilzen ungelöst zurückbleibt. E.Winterstein konnte 1894 zeigen, daß die alkaliunlöslichen Membranstoffe, die er als "Pilzzellulose" bezeichnet, bei den von ihm untersuchten Basidiomyceten Chitin, außerdem aus Glucose aufgebaute Komplexe enthalten (50). Diese Feststellung wurde durch spätere Arbeiten wiederholt bestätigt (Gibson 1895 (51), Scholl 1908 (52), Prosouriakow 1926 (53), Takata 1929 (42),

Behr 1930 (54), Normann et al. 1932 (55), und Schmidt 1936 (56)). Scholl erhielt aus der Pilzzellulose von Boletus edulis reines Chitin, indem er die unlöslichen Glucane durch Oxydation mit Kaliumpermanganat wasserlöslich machte (52). Die Rückstände betrugen 5-6 % des Gesamtfruchtkörpers. In den Hydrolysaten der alkaliresistenten Substanz wurden außer Glucose und Glucosamin keine weiteren Zucker nachgewiesen. Die mikrochemischen Zellulosereaktionen waren negativ.

In neuerer Zeit wurden unlösliche Mannane in den Zellwänden verschiedener Hefen gefunden (Garzuly Janke 1940 (57, 42)).

In anderen Pilzen ließ sich kein Chitin, dafür aber Zellulose in dem alkaliunlöslichen Rückstand nachweisen. F. von Wettstein vermutete 1921, daß der mikrochemische Nachweis von Chitin oder Zellulose in den Pilzmycelen systematisch phylogenetische Beziehungen zwischen den Pilzgruppen erkennen läßt (58). K.Nabel untersuchte daraufhin 1939 eine große Anzahl von Pilzen (meist Phycomyceten) durch mikrochemische Farbreaktion und stellte fest, daß bei den Chytridales und Blastocladiales Chitin-, bei den Oomyceten und Monoblepharidoles Zellulose-Membranen nachgewiesen werden können. Die untersuchten Eumyceten besaßen mit wenigen Ausnahmen (einige Ascomyceten) Chitinmembranen (3).

Zur Untersuchung der Kohlenhydrat-Bestandteile der Pilze nach ihrer Hydrolyse konnte die Identifizierung und Bestimmung der Monosaccharide bisher nur ungenau durch Herstellung der Hydrazone und Osazone, durch Gärung, Farbreaktion oder Reduktions- und Oxydationsversuche ausgeführt werden. In neuerer Zeit untersuchte W.R.Smithies 1952 die Kohlenhydrate von Penicillium griseofulvum (59). Er hydrolysierte mit konz. Schwefelsäure, erhitzte mit Orcin und photometrierte den erhaltenen Farbstoff gegen eine Vergleichslösung. Außerdem benutzte er papierchromatographische Methoden. Es gelang ihm aber nicht, die Monosaccharide sowohl eindeutig qualitativ, als auch quantitativ zu bestimmen.

2. Die Monosaccharide in den Pilzhydrolysaten

Wir wendeten die von uns ausgearbeiteten Hydrolysen- und Aufarbeitungsvorschriften an, um die Kohlenhydrat-Bestandteile einiger Pilze nach ihrer Hydrolyse mit Hilfe der Papierchromatographie genau zu identifizieren und quantitativ zu bestimmen. Bestimmt wurden die Monosaccharide, welche zu mehr als 0,1 % in der Pilzsubstanz vorhanden waren. Es läßt sich damit, was bisher aus Mangel an einer geeigneten Methode nicht möglich war, ein Überblick darüber gewinnen, welche und wieviel Monosaccharide an der Zusammensetzung der Pilz-Kohlenhydrate beteiligt sind.

Untersucht wurden im Freien gewachsene Fruchtkörper verschiedener Basidio- und Ascomyceten, ferner die auf künstlichem Nährböden gezüchteten Gesamtmycele des Ascomyceten Penicillium chrysogenum und des Actinomyceten Streptomyces griseus [x].

Außer den unvorbehandelten Exemplaren wurden auch die "Membran- und "Skelett-Substanzen" einiger Pilze hydrolysiert. Durch Extraktion der Materialien mit Alkohol-Benzol, Wasser und verdünnter Säure entfernten wir lipoidlösliche und niedermolekulare Stoffe, sowie lösliche Proteine und Saccharide, was ungelöst bleibt wird "Membransubstanz" genannt. Nach weiterer Behandlung mit heißer Lauge bleibt die "Skelettsubstanz" zurück.

In Tab. 1o sind die Analysenergebnisse der untersuchten Objekte zusammengefaßt.

[x] Die beiden Pilze dienten zur technischen Penicillin- bzw. Streptomycin-Gewinnung in dem Penicillinwerk der Farbenfabriken Hoechst, A.G. Wir verdanken sie dem Entgegenkommen von Herrn Dr. Oeppinger.

Tab. 1o **% Monosaccharid-anhydrid in der getrockneten Pilzsubstanz verschiedener Basidio-, Asco- und Actinomyceten.**
(Mittelwerte aus je 6 chromatographischen Einzelbest.)

Basidiomyceten	Galaktose-	Glucose-	Mannose-	Xylose-	Ribose-	Acetylglucosamin-anhydrid	Summe d. Monosacch.-anhydride
Gasterales							
1. Bovista nigrescens (jung) (x) (Eierbovist)	o	44,8	1,1	<o,1	<o,1	4,7	5o,6
- Skelettsubstanz (= 17 %)	o	59,6	1,6	o	o	21,6	82,8
2. Lycoperdon gemmatum (jung) (Flaschenbovist)	2,3	9,8	1,o	o	< o,1	12,7	25,8
3. Geaster fimbriatus (Erdstern)	o,9	5,5	5,4	o,9	< o,1	4,3	17,o
4. Phallus impudicus (Stinkmorchel)	o,8	21,1	11,8	o	< o,1	4,8	37,5
Aphyllophorales							
5. Clavaria botrytis (Ziegenbart rötlich)	1,o	22,8	2,2	o,1	<o,1	5,4	32,2
6. Clavaria flava (Ziegenbart zitronengelb)	1,2	16,9	16,9	1,8	<o,1	5,8	42,6
- Stiel						6,1	
- Äste						5,3	
7. Clavaria pallida (Ziegenbart blass)	1,7	19,3	3,2	1,o	o,2	3,5	28,9
8. Clavaria pistillaris alt (x) (Herkuleskeule) jung	1,1	17,1	3,3	o,1	o,1	5,9	27,6
	o,4	12,4	o,1	o	< o,1	5,5	18,o
- Skelettsubst. von alt (=14%)	o	37,3	6,4	o	o	35,4	79,1
9. Cantharellus cibarius (alt) (Pfifferling)	o	22,7	3,1	o,9	< o,1	5,7	32,4
- Stiel						5,9	
- Hut						5,o	
- Skelettsubst. (= 15 %)	o	46,4	7,1	o	o	27,6	81,1
Cantharellus cibarius (jung)	o	17,9	3,6	1,4	<o,1	4,5	27,4
1o. Craterellus cornucopioides (x) (Herbsttrompete)	<o,1	15,2	4,2	2,3	<o,1	5,1	26,8
- Skelettsubst. (= 7 %)	o	4,7	5,6	o	o	63,5	73,8

	Galaktose-	Glucose-	Mannose-	Xylose-	Ribose-	Acetylglucosamin-anhydrid	Summe d. Monosaccharidanhydride
11. Polyphorus igniarius (Feuerschwamm)	o,7	36,3	3,1	1,8	< o,1	(6,8)	48,7
- Lamellen						8,1	
- Fleisch						5,3	
12. Polyphorus officinalis (x)	o	18,9	1,o	o,2	< o,1	2,7	22,3
- Skelettsubst. (= 5%)	o	51,4	2,3	o	o	4o,2	93,9
Boletales							
13. Trachypus scaber (Birkenröhrling)	1,1	3o,2	1,8	o,7	< o,1	(6,2)	4o,o
- Stiel						7,5	
- Hut						5,6	
- Röhren						5,6	
14. Boletus edulis (Steinpilz)							
- Stiel	2,4	28,8	1,7	o,5	< o,1	14,4	47,9
- Hut	2,o	24,o	2,4	o,4	< o,1	5,2	34,o
- Röhren	1,o	8,8	o,7	< o,1	< o,1	7,5	18,o
- Skelettsubst. (=12 %) (x)	o	42,3	3,7	o	o	4o,8	86,8
15. Xerocomus badius (Maronenröhrling)	1,1	1o,7	1,6	o,2	o,3	5,6	19,5
- Stiel						6,5	
- Hut						5,4	
- Röhren						4,8	
16. Xerocomus subtomentosus (Ziegenlippe)	1,o	2o,6	1,o	o,5	o,2	5,8	28,1
Agaricales							
17. Paxillus involutus (Kahler Krempling)	1,3	32,6	1,1	1,6	o,2	(5,o)	41,8
- Stiel						6,2	
- Hut + Lamellen						3,6	
18. Paxillus atrotomentosus (Samtfusskrempling)	1,3	3o,2	2,o	o,7	< o,1	3,7	37,9
19. Gomphidius glutinosus (Gelbfüssiges Kuhmaul)	o,5	32,3	o,9	o,8	o,2	(4,5)	39,2
- Stiel						5,o	
- Hut + Lamellen						3,5	

	Galaktose-	Glucose-	Mannose-	Xylose-	Ribose-	Acetylglucosamin-anhydrid	Summe d. Monosaccharidanhydride
20. Lactarius sanguifluus (Blutreizker)	0,9	29,1	3,5	1,1	<0,1	(4,3)	37,9
- Stiel						4,9	
- Hut						3,8	
- Lamellen						4,2	
21. Lactarius rufus (Rotbrauner Milchling)	1,6	18,8	1,4	1,7	0,2	(5,9)	29,6
- Stiel						3,3	
- Hut + Lamellen						5,3	
22. Lactarius deliciosus (Echter Reizker)	<0,1	26,8	1,9	0,5	0,2	(3,9)	33,3
- Stiel						4,6	
- Hut + Lamellen						3,0	
- Skelettsubst. (- 15 %)(x)	0	62,6	2,5	0	0	16,6	81,7
23. Russula vesca (Speisetäubling)	0,7	22,4	2,2	0,7	<0,1	(4,5)	30,3
- Stiel						5,0	
- Hut + Lamellen						3,2	
24. Russula emetica (Speitäubling)	0,8	21,3	1,4	0,9	<0,1	(4,1)	28,5
- Stiel						4,6	
- Hut + Lamellen						3,6	
25. Hygrophorus eburneus (Elfenbeinschneckling)	0,8	15,5	2,1	1,2	<0,1	(4,8)	24,4
- Stiel						5,6	
- Hut + Lamellen						3,6	
26. Armillaria mellea (Hallimasch)	1,0	28,5	1,5	0,5	0,1	(6,6)	45,4
- Stiel						7,0	
- Hut + Lamellen						6,3	
27. Tricholoma rutilans (Roter Ritterling)	0,6	33,2	2,5	1,1	<0,1	(3,2)	40,6
- Stiel						3,2	
- Hut + Lamellen						3,2	
28. Tricholoma albobrunneum (Weissbrauner Ritterling)							
- Stiel	1,5	30,2	2,1	0,7	<0,1	3,7	38,2
- Hut	1,1	25,0	1,4	0,1	<0,1	3,9	31,5
- Lamellen	1,5	16,0	1,9	0,9	<0,1	4,8	25,1

	Galaktose -	Glucose -	Mannose -	Xylose -	Ribose -	Acetylglucosamin - anhydrid	Summe d. Monosaccharid-anhydride
29. Clitocype inversa (Rotbrauner Trichterling)	1,1	16,8	1,4	0,7	0,6	(8,3)	29,7
- Stiel						9,6	
- Hut + Lamellen						6,7	
30. Amanita muscaria (Fliegenpilz)	1,2	25,3	1,2	0,5	< 0,1	9,5	37,7
- Stiel						11,7	
- Hut + Lamellen						4,7	
31. Amanita citrina (Gelber Knol enblättterpilz)	1,1	25,6	1,7	0,4	0,1	(8,0)	36,4
- Stiel						9,5	
- Hut + Lamellen						4,7	
32. Amanita pantherina (Pantherpilz)	0,9	21,2	0,9	0,2	< 0,1	(7,5)	30,7
- Stiel						8,9	
- Hut + Lamellen						4,5	
33. Lepiota procera (Parasolpilz)							
- Stiel	1,0	17,0	1,3	0	< 0,1	10,1	37,4
- Hut	1,0	24,0	0,6	0	0,1	6,7	32,3
- Lamellen	0,8	14,7	0,7	0	0,4	6,6	23,2
- Skelettsubst. (= 15 %) (x)	0	22,8	4,3	0	0	60,9	87,9
34. Coprinus comatus (Schopftintling)	< 0,1	43,4	0	0	< 0,1	(4,3)	47,7
- Stiel						4,6	
- Hut + Lamellen						3,7	
35. Pholiota mutabilis (Stockschwamm)	0	29,5	1,5	0,3	0,1	(6,5)	37,7
- Stiel						7,6	
- Hut + Lamellen						5,0	
36. Nematoloma fasciculare (Schwefelkopf grünblättrig)	1,0	21,9	1,3	3,2	0,4	(7,3)	35,1
- Stiel						7,2	
- Hut + Lamellen						5,0	
37. Nematoloma epixanthum (Schwefelkopf gelblich)	1,1	30,6	1,4	2,6	0,2	(5,5)	41,4
- Stiel						7,0	
- Hut + Lamellen						4,1	

	Galaktose-	Glucose-	Mannose-	Xylose-	Ribose-	Acetylglucosamin-anhydrid	Arabinose-	Galakturonsäure-	Summe d. Monosacch.-anhydride
38. Nematoloma capnoides (Schwefelkopf rauchgrau)	1,2	42,1	2,5	5,o	o,2	4,5	o	o	55,5
- Stiel						4,8	o	o	
- Hut + Lamellen						4,2	o	o	
Ascomyceten									
39. Helvella crispa (Herbstlorchel)	o	31,2	3,4	o	<o,1	5,2	o	o	39,8
4o. Humaria rutilans (Becherpilz)	o,9	25,4	3,7	o	<o,1	4,3	o	o	34,3
41. Penicillium chrysogenum (x)	2,6	17,4	4,2	o	o,3	7,5	o	o	32,o
-Membransubst. (=51 %)	1,7	35,3	4,1	o	o	12,5	o	o	43,6
-Skelettsubst. (=15 %)	o	42,3	8,3	o	o	37,5	o	o	88,1
Actinomyceten									
42. Streptomyces griseus (x)	5,4	13,1	1,7	1,2	<o,1	o,3	3,1	3,3	28,1
-Membransubst. (=46 %)	o	21,4	2,2	2,4	o	-	o	1,9	27,9
-Skelettsubst. (= 8 %)	o	86,3	o	o	o	-	o	o	86,3

49. und 5o. von der Penicillinfabrik der Farbenfabriken Hoechst A.G. zur Verfügung gestellt. 9. wurde im September 1955, die anderen Exemplare im September 1954 in den Wäldern um Würzburg gesammelt. Ausser den besonders bezeichneten Beispielen waren die Exemplare ausgewachsen jedoch nicht überaltert.

Die neutralen Monosaccharide und die Galakturonsäure wurden aus mit kons. Schwefelsäure bzw. überkonz. Salzsäure hergestellten Hydrolysaten bestimmt. Die mit (x) bezeichneten Exemplare wurden mit überkonz. Salzsäure hydrolysiert. Glucosamin wurde aus mit 7n HCl bei 1oo° erhaltenen Hydrolysaten bestimmt. 49. und 5o., die mit dem künstlichen Nährboden verunreinigt waren, sowie die Werte der Membran- und Skelettsubstanzen sind auf aschefreie Substant bezogen. Die übrigen Angaben beziehen sich auf die Gesamtsubstanz (ohne Abzug anorg. Stoffe.)

Die in ( ) gesetzten Acetylglucosamin-anhydrid- (Chitin-) Werte wurden aus denen der Stiele, Hüte und Hymenia und deren Gew.-verhältnis zueinander errechn

3. Diskussion der Ergebnisse

Die in Tab. lo angegebenen Werte können nach den auf Seite 6 und 8 niedergelegten Erfahrungen maximal bei den Hexosen und Glucosamin um ca. 5 %, bei den Pentosen um lo-15 % zu niedrig sein. Da jedoch sowohl die Hydrolysen wie die chromatographischen Bestimmungen in allen Fällen gleichartig durchgeführt wurden, sind die Analysenergebnisse untereinander durchaus vergleichbar.

a. Die Monosaccharide in den Hydrolysaten

Qualitative Analyse

Die untersuchten Basidio- und Ascomyceten lieferten nach ihrer Hydrolyse immer nur die gleichen Monosaccharide: Glucose, Glucosamin, Mannose, sowie Galaktose und Xylose. In einigen Fällen war Ribose ebenfalls nachweisbar. Bemerkenswert ist, daß die Pilz-Kohlenhydrate nur diese geringe Zahl von Monosaccharid - Komponenten enthalten, von denen Galaktose und Xylose häufig fehlen.

Von sämtlichen untersuchten Beispielen enthält nur S.griseus (Nr.42) außer den erwähnten Monosacchariden noch Arabinose und Galakturonsäure in nachweisbaren Mengen.

In keiner der Pilzarten konnten weitere sonst in höheren Pflanzen verbreitet vorkommende Monosaccharide, wie z.B. Arabinose, Rhamnose oder Fructose nachgewiesen werden.

Quantitative Analyse

An der Zusammensetzung der Pilz-Substanz beteiligte Stoffe

Außer den Kohlenhydraten sind an der Zusammensetzung der Pilzsubstanz im wesentlichen Proteine, andere Extraktivstoffe (z.B. Mannit, Erythrit, Fumarsäure, Weinsäure, Betain, Methylamin) und Lipoide beteiligt; ferner enthalten die Substanzen anorg. Stoffe (Glührückstand).

Stickstoff- und Kohlenhydrat-Gehalt der Pilze stehen in gegenseitiger Abhängigkeit, ist der eine Wert groß, so ist der andere entsprechend klein. Aus Tab. 11 geht hervor, daß die Kohlenhydratreichen Arten weniger Stickstoff-haltige Stoffe als die Kohlenhydrat-armen besitzen.

In dieser Tabelle wird der Stickstoffwert (nach Abzug des

Chitin-Anteils) auf Protein bezogen und die Summe aus dem Protein-, Kohlenhydrat- und Asche-Gehalt gebildet. Es ließen sich damit 50-100 % der in den Pilzsubstanzen vorhandenen Stoffe erfassen. Die Differenz zu 100 % ist auf Stickstoff-freie Extraktivstoffe und Lipoide zurückzuführen, die nicht mit in den Summenwert eingehen.

Tab. 11 Vergleich d.Stickstoff-,Kohlenhydrat-und Aschewerte

	% N nach Abzug des Chitinanteiles	N-Wert mit 6 multipl. (Protein %)	Saccharidgehalt	Aschegehalt	Summe von:
		a	b	c	a+b+c
Geaster fimbriatus	7,57	45,4	17,0	9,8	72,2
Clavaria pistillaris					
- alt	2,72	16,3	27,6	9,9	53,8
- jung	3,90	23,4	18,3	7,0	48,7
Cantharellus cibarius					
- alt	3,05	18,3	32,4	9,9	60,6
- jung	4,41	26,5	27,4	7,6	61,6
Boletus edulis					
- Stiel	3,51	21,1	47,9	3,6	72,6
- Röhren	10,09	60,4	32,0	8,1	100,5
- Hut	5,49	32,9	18,0	3,6	54,5
Coprinus comatus	3,28	19,7	47,7	12,1	79,5
Nematoloma capnoides	2,74	16,4	55,5	4,4	76,3

Analyse der verschiedenen Organe des gleichen Exemplares

Die einzelnen Organe (Stiel, Hut und Hymenium) gleicher Pilz-Individuen unterscheiden sich in ihrem Kohlenhydrat-Gehalt. Wie an den Beispielen von B.edulis, T.albobrunneum und L.procera (Nr. 14, 28, 33) gezeigt wird, ist die Summe der Monosaccharidanhydride in den Stielen am größten, in den Hymenia am kleinsten. Die Stiele können einen doppelt so hohen Kohlenhydrat-Gehalt aufweisen wie die Hymenia (B.edulis). Dementsprechend haben z.B. der Stiel von B.edulis den geringsten, die Röhren den höchsten Stickstoff-Gehalt (vgl. Tab. 11).

Den größten Anteil an der Zusammensetzung der Kohlenhydrate

hat die Glucose, der die Hälfte bis drei Viertel des Gesamt - kohlenhydrat-Gehaltes der untersuchten Organe ausmacht. Die übrigen neutralen Monosaccharide (Mannose, Galaktose, Xylose, Ribose) sind in den Hydrolysaten nur in geringer Menge innerhalb der Grenzen von o-2,5 % nachweisbar. Ribose wurde nur in den Hymenia in bestimmbarer Menge erkannt. Sie stammt sehr wahrscheinlich aus den Ribonukleinsäuren der Sporen.

Glucosamin-Bestimmungen wurden an den einzelnen Organen von 27 verschiedenen Pilz-Exemplaren ausgeführt. Bei Annahme, daß das Glucosamin nur als Acetylglucosamin-anhydrid (Chitin) vorlag, läßt sich aussagen, daß die Stiele ihrer Stützfunktion entsprechend einen höheren Chitin-Gehalt besitzen (bis zu 18 % bei einem alten Exemplar von L.procera (Nr.33)) als die Hymenia bzw. Hüte. Der Unterschied im Chitin-Gehalt zwischen den untersuchten Pilz-Organen beträgt maximal 64 %. Sein Anteil am Gesamtkohlenhydrat-Gehalt macht etwa 1o-5o % aus.

Analyse ungleichaltriger Exemplare der gleichen Art

Die Summe der Monosaccharid-anhydride eines alten Pilzexemplares ist größer als die eines jungen (C.pistillaris, C.cibarius (Nr. 8, 9). Es sind besonders Glucane, die sich mit zunehmendem Alter im Fruchtkörper anreichern (z.B. Zunahme des Glucan - Gehaltes von 12,4 % auf 17,1 % bei C.pistillaris), ferner enthalten die alten Exemplare mehr Chitin als die jungen (z.B. Zunahme des Chitin-Gehaltes von 4,5 % auf 5,7 % bei C.cibarius). Die übrigen Monosaccharide (Mannose, Galaktose, Xylose, Ribose) treten im alten wie im jungen Pilz stark zurück, und aus den geringfügigen Schwankungen der Werte läßt sich nicht erkennen, ob sie auf Altersunterschiede zurückzuführen sind.

Die zum Vergleich durchgeführten Stickstoff-Bestimmungen zeigen, daß entsprechend der Zunahme des Kohlenhydrat-Gehaltes mit fortschreitendem Alter des Fruchtkörpers sein Stickstoff - Gehalt abnimmt (vgl. Tab. 11). Der Pilzfruchtkörper verbraucht die Proteine und Extraktivstoffe und dadurch tritt eine prozentuale Anreicherung von Gerüststoffen wie Chitin und gewissen Glucanen ein.

Kohlenhydrat-Gehalt und Lebensbedingungen

Systematische Versuche wurden mit niederen Pilzen von Porges 1932, von Schulz 1937 am A. niger (6o) auf künstlichen Nährböden unter Konstanthaltung der sonstigen Lebensbedingungen (Temperatur, Luftfeuchtigkeit etc.) durchgeführt. Durch Variation der Bedingungen veränderte sich das Verhältnis der mit verschiedenen Lösungsmitteln (org.Lösungsmittel, kaltes und heißes Wasser, Säure oder Lauge) extrahierbaren Stoffe zueinander.

Die im Freien gewachsenen Pilze sind im Verlaufe ihrer Entwicklung häufigen Veränderungen der Lebensbedingungen ausgesetzt, die von uns nicht beobachtet werden konnten (z.B. Bodenbeschaffenheit, Luftfeuchtigkeit, Temperatur, Sonneneinstrahlung etc.). Es lassen sich somit auch keine Aussagen darüber machen, inwieweit durch sie Schwankungen der Kohlenhydrat-Zusammensetzung in den Pilzen auftreten. Die in Tab. 1o aufgeführten Exemplare wurden (außer den besonders bezeichneten) im gleichen Jahr zur gleichen Jahreszeit (Ende September 1954) in den Waldgegenden um Würzburg gesammelt.

Unterschiede im Kohlenhydrat-Gehalt zwischen den verschiedenen Arten

Die in diesem Abschnitt miteinander verglichenen Arten waren Exemplare, die ihrer Größe und ihren sonstigen Merkmalen nach ausgewachsen, jedoch nicht überaltert erschienen.

Zur Bestimmung der Kohlenhydrate in den Gesamt-Fruchtkörpern war das Gewichtsverhältnis von Stiel zu Hut zu Hymenium stets so gewählt, daß es dem natürlichen entsprach (Längsschnitte durch den ganzen Pilz).

Die Summen der Monosaccharid-anhydride schwanken zwischen den Extremwerten von 17 % (G.fimbriatus (Nr. 3)) und 55 % (N.eapnoides (Nr.38)). Die meisten der ermittelten Werte liegen in der Größenordnung von 3o-4o %.

Die Glucose hat in allen Fällen von den einzelnen Monosacchariden den größten Anteil. Bis zu 92 % des Gesamtkohlenhydrat-Gehaltes kann er ausmachen (C.comatus (Nr34)). Die Angaben über den Glucan-Anteil in der Pilzsubstanz liegen meistens zwischen 2o-3o %, einen extrem niedrigen Wert finden wir bei

C.fimbriatus (Nr.3) mit 5,5 %, einen extrem hohen bei P.nigrescens (Nr.1) mit 44,8 %.

Der Chitin-Gehalt liegt in fast allen Fällen der untersuchten Pilze innerhalb der Grenzen von 3-7 %. Nur in L.gemmatum (Nr.2) ließ sich wesentlich mehr Glucosamin nachweisen (12,7% Chitin). Wahrscheinlich ist dieser hohe Wert auf den hohen Sporengehalt des Pilzes zurückzuführen. Einen extrem niedrigen Glucosamin - Gehalt hat der Actinomycet S.griseus (Nr.42) (0,3 % Chitin).

Die Mannan-Werte liegen in der Mehrzahl zwischen 1-5 %. Zwischen Mannose- und Glucose-Gehalt lassen sich Beziehungen erkennen. Objekte, die einen hohen Mannan-Gehalt aufweisen, besitzen relativ wenig Glucose (P.impudicus, C.flava (Nr.4, 6)). Ein Gegenbeispiel bietet der Pilz C.comatus (Nr.34). In diesem Pilz, der, wie bereits erwähnt, einen extrem hohen Glucan-Anteil an der Summe der Monosaccharid-anhydride hat, fehlt die Mannose völlig.

Der Galaktose- und Xylose-anhydrid-Gehalt war in fast allen analysierten Exemplaren geringer als 2 %. Häufig konnten diese Monosaccharide überhaupt nicht nachgewiesen werden. Nur N.capnoides (Nr.38) (5 % Xylan) und S.griseus (Nr.42) (5,4 % Galaktan) lieferten höhere Werte.

Innerhalb der Familien der Basidiomyceten lassen sich bisweilen zwischen den Arten größere Unterschiede in Kohlenhydrat-Gehalt und - Zusammensetzung erkennen (z.B. Clavaria, Nematoloma), als zwischen Species, die verschiedenen Familien und Ordnungen angehören. Selbst die Saccharid-Werte der untersuchten Asco - myceten liegen innerhalb der Grenzen, zwischen denen auch die der Basidiomyceten schwanken. Systematische Beziehungen zwischen den Familien, Ordnungen oder den beiden Klassen auf Grund des verschiedenen Kohlenhydrat-Gehaltes der Arten lassen sich also nicht erkennen. Dagegen unterscheidet sich, wie bereits erwähnt, die Kohlenhydrat-Zusammensetzung des einen untersuchten Actino-myceten S.griseus (Nr.42) wesentlich von jenen der analysierten Basidio- und Ascomyceten. (vgl. auch S. 18).

b. Die Polysaccharide der Pilze

Die Untersuchung der Pilze im unvorbehandelten Zustand und nach Extraktion mit Wasser, Säure und Lauge zeigt an, welche Polysaccharide löslich und welche Zellmembran- bzw. unlösliche Skelett-Bestandteile sind. Die Werte der nach Hydrolyse der Gesamt-, "Membran-" und "Skelett-Substanzen" quantitativ bestimmten Monosaccharid-anhydride werden auf jene bezogen, die angeben, wieviel Prozent der Gesamtsubstanz nach den verschiedenen Extraktionen zurückbleibt. Es ergibt sich daraus, welche und wieviel der Saccharide gelöst werden (Tab. 12 und Tab. 13).

Die einzelnen aus den Pilzhydrolysaten bestimmten Monosaccharide sind keine Spaltprodukte ursprünglich einheitlicher Stoffe, sondern entstammen Polysacchariden, die sich voneinander durch ihre verschiedene Löslichkeit in heißem Wasser, kalter verd. Säure oder heißer Lauge unterscheiden. Es handelt sich wahrscheinlich um ähnliche Hexosane und Pentosane, wie sie bereits auf den Seiten 16 - 18 diskutiert worden sind.

In Wasser, verd. Säure und Lauge lösliche Polysaccharide

Mannose, Galaktose und Glucosamin können, wie z.B. bei P.chrysogenum, die Hydrolysenprodukte von sowohl in Wasser und verd. Säure, wie auch von in Lauge löslichen Polysacchariden sein. Durch die Extraktionen wird stets Glucosamin entfernt (10-25 %). Der Aminozucker ist also nicht nur am Aufbau des reinen laugeunlöslichen Chitins beteiligt, sondern findet sich auch in Wasser-, Säure- und Lauge-löslichen Stoffen. Durch die Laugeextraktion wird meist der größte Teil der Mannane entfernt (etwa drei Viertel des Mannose-anhydrids), er kann aber auch (z.B. B.edulis, L.procera) wesentlich kleiner sein (etwa ein Viertel des Mannose-anhydrids). Die Mannane von S.griseus sind sämtlich in Lauge löslich. Die Galaktane werden in allen Fällen durch Lauge völlig entfernt.

Es lassen sich, z.B. bei S.griseus, neben laugelöslichen auch in Wasser und verd. Säure lösliche Glucane nachweisen. Wie z.B. bei P.chrysogenum ist es auch möglich, daß sämtliche Glucane in Wasser und verd. Säure unlöslich sind. Die Glucane unserer als Beispiel gewählten Exemplare sind zu etwa drei Viertel

Tab.12 Monosacch.-anhydride, die aus der Gesamtsubst. bei Darstellung der Membransubst. extrahiert werden (Zahlenangaben in %).

	Galaktose	Glucose	Mannose	Xylose	Ribose	Acetylglucosamin	Arabinose	Galakturonsäure
Ascomyceten								
Penicillium chrysogenum	67	o	51	-	100	15	-	-
Actinomyceten								
Streptomyces griseus	100	25	41	9	100	-	100	74

Tab.13 Monosacch.-anhydride, die aus der Gesamtsubst. bei Darstellung der Skelettsubst. extrahiert werden (Zahlenangaben in %).

	Galaktose	Glucose	Mannose	Xylose	Ribose	Acetylglucosamin	Arabinose	Galakturonsäure
Basidiomyceten								
Bovista nigrescens	-	77	98	100	100	22	-	-
Clavaria pistillaris	100	79	73	100	"	13	-	-
Cantharellus cibarius	-	76	68	100	"	10	-	-
Craterellus cornucopiodes	100	98	91	100	"	13	-	-
Polyphorus officinalis	-	86	88	100	"	25	-	-
Boletus edulis	100	80	26	100	"	20	-	-
Lactarius deliciosus	100	65	80	100	"	25	-	-
Lepiota procera	100	81	30	-	"	15	-	-
Ascomyceten								
Penicillium chrysogenum	100	64	71	-	"	25	-	-
Actinomyceten								
Streptomyces griseus	100	48	100	100	"	-	100	100

in Wasser, Säure und Lauge löslich. Nur S.griseus enthält weniger laugelösliche Glucane, was darauf zurückzuführen ist, daß er als einziger der untersuchten Pilze Zellulose enthält. Die Glucane ließen sich durch Behandlung der Pilz-Substanzen mit verdünnter Jodlösung braun anfärben. Diese Reaktion deutet auf Glycogen und schließt ein Vorhandensein von Stärke aus, läßt aber nicht erkennen, ob dem "Mycodextran" (s.S. 16) ähnliche Glucane vorliegen. Wie bei den von Ergle (39) beschriebenen Glycogenpräparaten können auch hier zweierlei Formen des Glycogens vorhanden sein, von denen die eine mit Wasser und verd. Säure, die andere mit Lauge extrahierbar ist.

Die Xylane sind, wie z.B. die bereits 1891 von Voswinkel beschriebenen Pentosane (45, 38), in Wasser und verd. Säure nur wenig löslich. Durch Lauge-Extraktion lassen sie sich völlig entfernen.

Die Ribose-haltigen Stoffe lassen sich schon mit Wasser und verd. Säure quantitativ extrahieren. Es handelt sich hier vermutlich um Ribonukleinsäuren.

Die Galakturonsäure, die sich in den Hydrolysaten von S.griseus nachweisen ließ, entstammt zwei verschiedenen Polyuronsäuren, von denen die eine, die vermutlich von dem Arabinoseanhydrid begleitet wird, in Wasser und verd. Säure, die andere in Lauge löslich ist. Es scheinen hier ähnliche Pektinstoffe vorzuliegen, wie sie häufig bei höheren Pflanzen gefunden werden.

In Lauge unlösliche Polysaccharide

Aus der Tab. 13 läßt sich erkennen, daß nach der Lauge-Extraktion aus Glucose, Mannose und Glucosamin bestehende Polysaccharide ungelöst zurückbleiben. Die Rückstände betrugen 5-18 % der getrockneten Pilz-Substanz (s.Tab. 10). Wir fanden, daß die laugeunlöslichen "Skelettsubstanzen" der Basidio- und Ascomyceten entsprechend den auf Seite 18 angeführten Ergebnissen anderer Autoren neben Chitin noch aus Glucose aufgebaute Komplexe enthalten. Das Chitin ist auch durch mikrochemische Farbreaktion nachweisbar, das Glucan zeigt keine Zellulosereaktion. Das Verhältnis zwischen Chitin und Glucan kann recht verschieden sein. So enthält z.B. die Skelettsubstanz von C.cornucopiodes

(Nr. 1o) neben viel Chitin (65,5 %) wenig Glucan (4,7 %), dagegen die von L.deliciosus (Nr. 22) neben wenig Chitin (16,6 %) viel Glucan (62,9 %). Die Verhältnisse bei den übrigen Beispielen liegen zwischen diesen Extremwerten.

Wir konnten feststellen, daß sich in den Hydrolysaten stets noch geringe Mengen Mannose nachweisen lassen. Die Mannan-Werte schwanken innerhalb der Grenzen von 1,6 - 5,6 %.

Im Gegensatz zu den "Skelettsubstanzen" der untersuchten Basidio- und Ascomyceten enthält die des Actinomyceten S.griseus (Nr. 42) kein Chitin in nachweisbarer Menge, hier besteht die "Skelettsubstanz" aus Zellulose, die auch durch mikrochemische Farbreaktion nachgewiesen werden kann (vgl. S. 18).

Zusammenfassung

Durch papierchromatographische Analyse wurden Kohlenhydrat-Gehalt und -Zusammensetzung einer größeren Anzahl von Pilzarten qualitativ und quantitativ ermittelt. Die Lösung einer solchen Aufgabe durch andere Methoden war bisher nicht möglich.

Untersucht wurden die im Freien gewachsenen Pilzfruchtkörper von 4o verschiedenen häufig vorkommenden Arten (38 Basidiomyceten und 2 Ascomyceten), außerdem die auf künstlichem Nährboden gezüchteten Gesamtmycele von Penicillium chrysogenum (Ascomycet) und Streptomyces griseus (Actinomycet). Bekanntlich dienen diese Pilze zur Gewinnung von Penicillin bzw. Streptomycin.

I.

Zu diesem Zweck mußten zunächst Hydrolysenmethoden ausgearbeitet werden, nach denen die Polysaccharide der Pilze weitestgehend bei minimaler Zersetzung der Monosaccharide gespalten werden.
1. Die optimale Hydrolyse der neutralen Polysaccharide wird erreicht durch 24 stdg. Behandlung der Pilze mit konz. Schwefelsäure (75 %ig) oder überkonz. Salzsäure (46,6 %ig) bei 2o°, der 6-8 stdg. Nachhydrolysen bei 1oo° mit verdünnter Säure folgen.
2. Zur Erzielung quantitativ auswertbarer Chromatogramme ist eine vollständige Entsäuerung der Hydrolysate notwendig. Sie wird

herbeigeführt durch Neutralisation mit Calzium- bzw. Silberkarbonat.

3. Die quantitative Bestimmung der Monosaccharide durch Formazan-Entwicklung gibt auch in Gegenwart von Eiweißspaltstücken und anderen Stoffen, die sich in Hydrolysaten von Pilzsubstanzen finden, richtige Werte.

4. Außer den neutralen Sacchariden sollte auch der Chitin-Gehalt der Pilze bestimmt werden. Es war dazu notwendig, auch hier die optimalen Hydrolysenbedingungen auszuarbeiten. Durch 4 stdg. Erhitzen in 7n Salzsäure auf 100° wird Chitin zu 95 % in Glucosamin gespalten.

5. Unter den gleichen Bedingungen wird auch Chitin von Insektenteilen optimal hydrolysiert, auch die Hexosamine (Glucosamin und Galaktosamin) von Knorpel, Mucin, Hyaluronsäure und Heparin werden vollständig freigelegt.

6. Es gelang, Glucosamin und Galaktosamin papierchromatographisch scharf voneinander und von anderen Sacchariden zu trennen, sodaß ihre Identifizierung und quantitative Bestimmung durch Reduktion von Triphenyltetrazoliumbase möglich wurde.

7. Es ist unerläßlich, auch bei der Bestimmung von Glucosamin und Galaktosamin die salzsauren Hydrolysate vor der Chromato - graphie zu entsäuern. Das geschieht am zweckmäßigsten durch Zugabe der berechneten Menge Silberkarbonat.

8. Werden die Hydrolysate, die außer den Hexosaminen noch Hexosen, Pentosen oder deren Spaltstücke enthalten, sauer zur Trockene eingedampft, dann treten starke Verluste an den Aminozuckern ein. Aus diesem Grunde führt eine jüngst von Tracey angegebene Methode zur kolorimetrischen Bestimmung von Hexosaminen zu unrichtigen Werten.

9. Aus den ausgeführten Hexosamin-Bestimmungen geht hervor, daß die bisher allgemein angewendete Bestimmungsmethode nach Elson und Morgan zu hohe Werte liefert. Sie gestattet zudem keine Unterscheidung zwischen den beiden Aminohexosen.

10. Die in dieser Arbeit entwickelte Methode zur papierchromatographischen Bestimmung der Hexosamine ist die erste allgemein anwendbare zur individuellen Bestimmung der weitverbreiteten Aminozucker und ihrer Polymeren.

II.

Die Analysen der Pilze wurden mit verschiedenen Organen eines gleichen Exemplares, mit ungleichaltrigen Exemplaren der gleichen Art und mit Gesamtsubstanzen verschiedener Arten ausgeführt. In den Hydrolysaten aller untersuchten Objekte wurden sowohl die neutralen Hexosen und Pentosen, als auch Glucosamin und die Uronsäuren quantitativ bestimmt.

1. Von den verschiedenen Organen des gleichen Exemplares ist der Kohlenhydrat-Gehalt der Stiele am größten, der Hymenia am kleinsten (z.B. besitzt der Stiel von Boletus edulis doppelt soviel Kohlenhydrate wie die Röhren).
2. Von ungleichaltrigen Exemplaren einer Art sind die alten Kohlenhydrat-reicher als die jungen (z.B. besitzt ein junges Exemplar von Clavaria pistillaris etwa nur drei Viertel soviel Kohlenhydrate wie ein altes).
3. Der Kohlenhydrat-Gehalt der untersuchten Fruchtkörper schwankt zwischen Werten von 17-55 %. Die Kohlenhydrat-reichen Pilzsubstanzen besitzen wenig, die Kohlenhydrat-armen viel Stickstoff-haltige Stoffe.
4. In den Hydrolysaten der Pilzsubstanzen konnten nur wenige und immer nur die gleichen Monosaccharide: Galaktose, Glucosamin, Glucose, Mannose, Ribose und Xylose nachgewiesen werden, von denen Galaktose und Xylose häufig fehlen. Der Actinomycet Streptomyces griseus enthält ferner Arabinose und Galakturonsäure.
5. An der Zusammensetzung der Kohlenhydrate in den verschiedenen Organen oder Gesamtfruchtkörpern hat die Glucose den größten Anteil (bis zu 92 % des Kohlenhydrat-Gehaltes). Chitin ist meist zwischen 3-7 % im Fruchtkörper enthalten, wesentlich mehr kann in den Stielen bestimmt werden, vor allem von älteren Exemplaren (z.B. 18 % bei Lepiota procera). Mannane finden sich in der Gesamtsubstanz allgemein zwischen 1-5 %, sie können auch völlig fehlen (z.B. Coprinus comatus). Galaktane und Xylane sind meist zwischen 0-2 %, Ribose meist weniger als 0,1 % in den Pilzhydrolysaten vorhanden.
6. Außer den unvorbehandelten Pilzen wurden auch die nach Extraktion mit Alkohol-Benzol, Wasser, Säure und Lauge erhaltenen

(2) "Membran-" und (1o) "Skelett-Substanzen" analysiert.

7. Es konnte dabei festgestellt werden, daß die in Wasser und verd. Säure löslichen Polysaccharide aus Galaktose, Glucosamin, Glucose, Mannose bzw. Xylose bestehen. Die nicht in Wasser und verd. Säure dafür aber in Lauge löslichen Polysaccharide bauen sich ebenfalls aus Galaktose, Glucosamin, Glucose, Mannose bzw. Xylose auf.

8. Die in den Extraktionsmitteln unlöslichen "Skelett-Substanzen" der untersuchten Basidio- und Ascomyceten bestehen aus Chitin und einem Glucan, das keine Zellulosereaktion gibt, ferner enthalten sie geringe Mengen Mannose-anhydrid. Die "Skelett-Substanz" des Actinomyceten Streptomyces griseus enthält dagegen nur Zellulose, die auch durch mikrochemische Farbreaktion nachgewiesen werden kann. Die "Skelett-Substanzen" sind das, was bisher "Fungin", "Pilzchitin" oder "Pilzzellulose" genannt wurde.

Die ausgearbeiteten Methoden der Hydrolyse und der Papierchromatographie haben sich als sehr geeignet erwiesen, um die Kohlenhydrate der Pilze serienmäßig qualitativ und quantitativ zu untersuchen. Sie werden sich ohne Schwierigkeiten auch auf die Untersuchung anderer Pilzklassen übertragen lassen.

Experimenteller Teil

A. Zur Bestimmung der neutralen Saccharide

I. Die Hydrolyse mit überkonz. Salzsäure bzw. konz. Schwefelsäure

1. Herstellung der überkonz. Salzsäure

In eine Waschflasche mit Glasfritte wird käufliche reine konzentrierte Salzsäure gefüllt und unter Kühlung mit Eis-Kochsalzmischung (-2o°) solange Chlorwasserstoff eingeleitet, bis eine auf eine Dichte von 1,246 geeichte Spindel aufsteigt. Durch Titration ergab sich der Gehalt der so hergestellten Säure zu 46,6 Gew.% Chlorwasserstoff. Andere Konzentrationen wurden durch Verdünnen mit Wasser hergestellt.

2. Ansatz der Hydrolysen

a. - mit überkonz. Salzsäure

Die auf o,1 mg genau eingewogene Substanz (5o-5oo mg) wird zusammen mit (1-1o ml) 46,6 Gew.%iger Salzsäure in ein dickwandiges Glasröhrchen eingeschmolzen. Um ein Absieden von Chlorwasserstoff zu vermeiden, müssen Rohr und Pipette vor dem Einbringen der Säure vorgekühlt werden. Auch nach dem beendeten Aufschluß muß das Rohr vor dem Öffnen gekühlt werden.

b. - mit konz. Schwefelsäure

Die Substanz wird auf o,1 mg genau in ein Reagenzglas eingewogen (5o-5oo mg) und mit (o,25-2,5 ml) reiner 75 Gew.%iger Schwefelsäure versetzt. Das Rohr wird mit einem Gummistopfen verschlossen.

3. Abhängigkeit des Hydrolysenverlaufs von Säurekonzentration und Zeit

Als Beispiel wurde die "Membransubstanz" von Penicillium chrysogenum bei 2o° mit 38-, 43- und 46,6 Gew.%iger Salzsäure, sowie mit 7o-, 75- und 8o Gew.%iger Schwefelsäure behandelt. Die Reduktionswerte bestimmten wir nach Lehmann-Maquenne-Schoorl (61). Angegeben sind sie als Prozente der Einwaage bei Annahme, daß diese aus reinem Glucan besteht.

Tab. 14 % Glucan nach Hydrolyse der Membransubst. von P. chrysogenum mit verschieden konzentrierter Salz- bzw. Schwefelsäure bei 2o° nach verschiedenen Zeiten. (cuprometrisch ermittelt.)

Stdn.	38 %ige HCl	43 %ige HCl	46,6 %ige HCl	7o %ige H_2SO_4	75 %ige H_2SO_4	8o %ige H_2SO_4
15	24,9	3o,o	35,o	23,1	21,6	17,1
24	31,5	35,1	4o,3	23,6	25,3	2o,o
48	36,2	4o,1	38,7	24,8	25,8	19,o
72	36,5	39,6	36,5	27,6	26,2	17,5
96	38,6	39,4	34,2	-	-	-
12o	-	-	-	29,6	24,2	16,2

Die Hydrolysen werden zweckmäßig 24 Stdn. lang mit 46,6 Gew. %iger Salz- bzw. 75 Gew. %iger Schwefelsäure ausgeführt. Die Substanz löst sich unter diesen Bedingungen völlig auf. Nach längerer Aufschlußdauer als 24 Stdn. färben sich die Hydrolysate dunkel (Zersetzung). Niedrigere Temperatur und geringere Säurekonzentration verzögern die Auflösung, höhere Temperatur läßt die Säuren stark zerstörend wirken. (vgl. S. 3)

II. Die Weiterverarbeitung der Hydrolysate und die Nachhydrolyse

1. Weiterverarbeitung der mit überkonz. Salzsäure hergestellten Hydrolysate

Destilliert man zur Entfernung der Salzsäure das Hydrolysat im Vacuum bis zur Trockene, so zeigt sich eine Abnahme des ursprünglichen Reduktionswertes (um etwa 5o - 75 %). Diese Erscheinung, die auf Reversionsvorgänge (1o-16) zurückzuführen ist, wird vermieden beim Eindampfen auf ein kleines Volumen. Man bemerkt dann ein Ansteigen des Reduktionswertes. Um diesen nachhydrolytischen Effekt mit der Entfernung der Hauptmenge der Säure zu verbinden, bewährte sich folgende Arbeitsweise am besten :

Das in 24 Stdn. bei 2o° aus etwa 5oo mg Substanz mit 1o ml 46,6 Gew.%iger Salzsäure erhaltene Hydrolysat wird quantitativ in einen 25o ml fassenden Spitzkolben gespült und die Lösung (ca. 1oo ml) im Vacuum bei einer Badtemperatur von 3o° bis auf 3 ml eingedampft. Zur Indikation wählten wir die Länge der

Siedekapillare so, daß ihr Ende beim Erreichen des Volumens von 3 ml über dem Flüssigkeitsspiegel steht und das Sprudeln aufhört. Das eingedampfte Hydrolysat wird genau auf 5o ml aufgefüllt.

2. Weiterverarbeitung der mit konz. Schwefelsäure hergestellten Hydrolysate

Die durch Behandlung von etwa 2oo mg Substanz mit 1 ml 75 Gew.%iger Schwefelsäure erhaltenen Hydrolysate werden auf genau 5o ml aufgefüllt.

3. Nachhydrolyse der mit den konz. Säuren erhaltenen Hydrolysate

Etwa 5 - 6 ml der nunmehr ca. o,5n salz- bzw. schwefelsauren Hydrolysate werden in Reagenzgläser eingeschmolzen und durch Erhitzen im siedenden Wasserbad die Nachhydrolyse durchgeführt. Zum Erreichen des maximalen Reduktionswertes genügt ein halbstündiges Erhitzen der salzsauren Lösung, während das schwefelsaure Hydrolysat 6-8 Stdn. auf 1oo° erhitzt werden muß.

Tab.15 Verlauf der Nachhydrolyse der mit überkonz. Salzsäure (a) bzw. mit konz. Schwefelsäure (b) (24 Stdn. bei 2o°) erhaltenen Hydrolysate der Membransubst. von P. chrysogenum. (cuprometrisch ermittelte Reduktionswerte. Angaben in % Glucan.)

		a	b
1. Nachhydrolyse des direkt auf o,5n Säuregehalt verdünnten Hydrolysates	1 Std.	43,6	31,5
	2 "	44,2	36,6
	4 "	44,6	4o,2
	6 "	45,5	45,6
	8 "	45,7	45,o
	24 "	43,o	42,5
2. Eindampfen auf 3 ml und 3o Min. in o,5 n Salzsäure erhitzen	-	45,6	-

Die Spaltung in die Monosaccharide während der Nachhydrolyse wurde mit Hilfe der quantitativen chromatographischen Analyse verfolgt. Der Basidiomycet Craterellus cornucopioides wurde z.B. mit konz. Schwefelsäure hydrolysiert und nach verschiedener Erhitzungsdauer der o,5 n schwefelsauren Lösung die Monosaccharide chromatographisch bestimmt. Die maximalen Werte werden nach 6-8 stdg. Nachhydrolyse erreicht.

Tab. 16 % Monosaccharid-anhydrid nach den verschiedenen Zeiten der Nachhydrolyse eines schwefelsauren Hydrolysates von C. cornucopioides. (chromatographische Bestimmung.)

Nachhydr.	1 Std.	2 Stdn.	3 Stdn.	4 Stdn.	6 Stdn.	8 Stdn.	16 Stdn.
Glucose	8,8	11,7	12,6	14,2	15,1	15,2	15,o
Mannose	1,1	3,2	3,2	3,2	4,2	4,2	4,1
Xylose	1,9	2,1	2,1	2,2	2,3	2,3	2,1

Die gleichen maximalen Werte wurden erhalten nach chromatographischer Bestimmung der Monosaccharide aus einem mit überkonz. Salzsäure erhaltenen Hydrolysat von C. cornucopiodes, das auf ein kleines Volumen eingedampft und 3o Min. nachhydrolysiert war.

III. Die restlose Entfernung der Säure

Zur störungsfreien Chromatographie der Hydrolysate muß die Schwefelsäure bzw. Salzsäure restlos entfernt werden. Dieses wurde in verschiedener Weise zu erreichen versucht :

1. Neutralisation mit Alkali

Nach Neutralisation der Säuren mit Alkali zeigt es sich, daß Salzkonzentrationen von o,5 m und darüber nach Auftragen von lo µl pro 2 cm Startstrich die chromatographischen Trennungen der Monosaccharide stören und "Schwänze" verursachen, die bis zur Startlinie reichen. Durch das Salz wird die Zusammensetzung der Verteilungsflüssigkeit Pyridin-Essigester-Wasser in der Art verändert, daß der homogenen Mischung das Wasser solange entzogen wird, bis eine gesättigte Salzlösung mitläuft. Dadurch werden die Laufbahnen der Monosaccharide verzerrt.

2. Verwendung eines Anionenaustauschers

Etwa 3 ml Lewatit MI 15o, in eine Säule vom Durchmesser 5 mm eingefüllt, reichen aus, um die in den Hydrolysaten noch befindliche restliche Säure zu binden. Wir ließen die nachhydrolysierte Lösung direkt in einen 25 ml Meßkolben tropfen (Durchlaufgeschwindigkeit 2 ml / Min.) und wuschen nach Absinken des Flüssigkeitsspiegels bis zur Harzoberfläche wiederholt mit Wasser nach, bis der Meßkolben gefüllt war.

Durch Vergleichsversuche wurde festgestellt, daß die neutralen

Zucker sowie Glucosamin quantitativ durch die Säule gehen. Die Mineralsäuren und die Uronsäuren werden zurückgehalten.

3. Fällung als schwerlösliche Verbindung

Die sauren, nachhydrolysierten Lösungen werden im Zentrifugengläschen mit der berechneten Menge Silber- bzw. Calziumkarbonat verrührt (Aciditat durch Titration bestimmt). Nach dem Abzentrifugieren des Silberchlorid- bzw. Calziumsulfat-Niederschlages im verschlossenen Glas (Verdunstung !) sind die Hydrolysate fertig zur Chromatographie. (Zur Neutralisation mit Silberkarbonat vgl. S. 43).

Durch Versuchsreihen konnte nachgewiesen werden, daß sich bei dieser Art der Säureentfernung die Zuckerkonzentration in den Hydrolysaten nicht wesentlich ändert. Eingewogene Gemische von Monosacchariden wurden in o,5 n Salz- bzw. Schwefelsäure gelöst und nach der Neutralisation die Zucker durch quantitative chromatographische Analyse bestimmt. Die Abweichungen der ermittelten Werte von den Einwaagen befinden sich innerhalb der Fehlergrenzen der chromatographischen Analyse.

Tab.17 Neutralisation saurer Zuckerlösungen mit (a) Silberkarbonat, mit (b) Calziumkarbonat. Formazan-Entwicklung. Werte aus je 6 Einzelbestimmungen.

	Einwaage pro 5o ml	nach Neutralisation bestimmt	Differenz in %
a. Glucosehydrat	4o,5 mg	4o,4 mg	-o,2
Galaktose	2o,3 "	2o,6 "	+1,3
Xylose	1o,6 "	11,2 "	+5,2
Mannose	5,o "	5,o "	o
b. Glucosehydrat	4o,3 "	39,9 "	-2,8
Galaktose	2o,1 "	2o,4 "	+1,5
Xylose	1o,9 "	1o,7 "	-1,8
Mannose	4,2 "	4,4 "	+4,8

B. Zur Bestimmung der Aminozucker

I. Die Hydrolyse Hexosamin-haltiger Polysaccharide

Konzentrierte Salzsäure (12n) löst gereinigtes Chitin (aus Garnelenschalen) bei 5o° schnell, bei 2o° hingegen selbst in 12 Stdn. nur ungenügend auf. Ungelöstes Chitin wird in 7n Salzsäure auch durch 6 stdg. Erhitzen auf 1oo° nicht vollständig hydrolysiert. Daher ist es notwendig, die Analysensubstanz zunächst in der konz. Salzsäure möglichst vollständig quellen zu lassen und zu lösen und erst dann mit Wasser auf 7n Salzsäure zu verdünnen. In einigen Fällen (z.B. Puppenhäute und Flügeldeckel von Insekten) werden die zu analysierenden Objekte von der konz. Säure nur schwer benetzt. Es ist dann erforderlich, vor der Hydrolyse die Lipoide zu extrahieren (z.B. mit Aceton oder Alkohol-Benzol). Selbst nach dieser Vorbehandlung lösen sich die Objekte nur schwer, auch bei 2-6 stdg. Behandlung mit der konz. Säure bei 5o°. Meistens jedoch (z.B. bei Mucosacchariden und Pilzmaterial) genügt ein Erwärmen auf 5o° für 2-4 Min. Die weitestgehende Spaltung des Chitins in Glucosamin durch 7n Salzsäure erfolgt durch 4 stdg. Erhitzen im siedenden Wasserbad.

Tab. 18 Erhitzen des vorher in konz. Salzsäure gelösten Chitins auf 1oo° in 5-7n HCl. Glucosamin (a) cuprometrisch, (b) chromatographisch ermittelt.

Hydrolysendauer (Stdn.)	Säure	Glucosamin-anhydrid in % der Einwaage	
		a	b
4	5n	-	69,8
4	6n	-	71,o
2	7n	78,2	7o,4
4	"	79,3	71,2
5	"	77,o	-
6	"	-	7o,4
8	"	75,4	67,1
17	"	73,7	-

Die cuprometrisch ermittelten Werte liegen etwa 11 % höher als die chromatographisch ermittelten. Dieses läßt darauf schließen,

daß reduzierende Zersetzungsprodukte chromatographisch nicht erfasst werden.

Auch Mucoitinschwefelsäure- bzw. Chondroitinschwefelsäure-haltiges Mucin und Trachealknorpel des Rindes werden von 7n Salzsäure in 4 Stdn. bei 100° maximal hydrolysiert.

Tab. 19 Erhitzen in 7n HCl auf 100°. Formazan-Entwicklung. Werte aus je 6 Einzelbestimmungen.

	Knorpel		Mucin	
Stdn.	Glucosamin-anhydrid %	Galaktosamin-anhydrid %	Glucosamin-anhydrid %	Galaktosamin-anhydrid %
4	1,0	8,2	10,8	6,0
8	1,0	8,4	11,1	6,0
15	0,8	7,7	11,3	6,3

15-150 mg Substanz (je nach Hexosamin-Gehalt) werden in einem Reagenzglas (15 x 1,5 cm) mit 1,0 ml reiner konz. Salzsäure (12 n) versetzt. Das Glas wird mit einem Gummistopfen dicht verschlossen bzw. zugeschmolzen und, bei gröber verteilten oder schwer quellbaren Stoffen, etwa 12 Stdn. bei Raumtemperatur stehen gelassen, dann verschlossen 2-4 Min. auf 50° erwärmt. Gut quellende Substanzen können sofort erwärmt werden. Nach dem Abkühlen wird die Säure mit 0,8 ml Wasser auf 7n verdünnt und das erneut zugeschmolzene Reagenzglas 4 Stdn. im siedenden Wasserbad erhitzt.

II. Die Entfernung der Säure

Die Hydrolysate werden auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt (etwa 25 ml), sodaß sie 200 - 800 µg pro ml enthalten. Die Entsäuerung wird (analog der mit überkonz. Salzsäure erhaltenen Hydrolysate) durch Neutralisation von 5 ml mit der (aus der verwendeten HCl - Menge) berechneten Menge Silberkarbonat direkt im Zentrifugenglas durchgeführt. Die Neutralisation darf nur bis p_H 4-5 erfolgen (Tüpfelprobe), es muß peinlich vermieden werden, daß sie bis p_H 7 fortschreitet und daß Silberionen in der Lösung verbleiben. Die Überschreitung des geforderten p_H - Wertes läßt sich in einfacher Weise durch Zugabe von ein bis zwei Tropfen

Eisessig zum Hydrolysat vor dem Auffüllen vermeiden. Die Entfernung der Salzsäure läßt sich auch mit Silberacetat durchführen, da dieses Salz jedoch schwer benetzt wird, braucht sie etwas mehr Zeit. Das Silberchlorid wird in dem mit einem Gummistopfen verschlossenen Glas abzentrifugiert und die abdekantierte Lösung zur Chromatographie verwendet.

Wie durch Kontrollbestimmungen nachgewiesen wurde (quant. chromatographische Analyse), ändert sich durch die beschriebene Neutralisation mit Silberkarbonat die Hexosamin-Konzentration in der Lösung nicht wesentlich. Die erhaltenen Werte streuten innerhalb der üblichen Fehlergrenze von ± 2 %. Auch Hydrolysate, die nur 20-100 µg Hexosamin pro ml enthalten, können ohne Verluste in dieser Weise entsäuert werden. Zur Chromatographie müssen dann allerdings unbequem große Mengen der Analysenlösung (bis 100 µl pro Startstrich) aufgetragen werden.

Tab. Neutralisation salzsaurer Glucosamin-Lösungen mit Silberkarbonat. (Kurzlaufmethode, Formazan-Entwicklung, Mittelwerte aus je 6 Einzelbestimmungen und je 4 Versuchsansätzen.) (a) vor, (b) nach der Neutralisation.

Salzsäure	mg Glucosamin-hydrochlorid / 25 ml		Differenz
	a	b	in %
0,7 n	8,8	8,7	-1,2
0,6 n	5,3	5,4	+1,9
0,5 n	1,02	1,04	+1,9
0,3 n	0,51	0,52	+2,2

Es besteht also auch die Möglichkeit Mikroanalysen durchzuführen. Einwaagen von 1-2 mg Substanz in ein Reagenzglas (6 x 0,7 cm) löst man in 0,10 ml konz. Salzsäure und verdünnt mit 0,08 ml Wasser. Das Hydrolysat wird zweckmäßig auf 5 ml aufgefüllt. Das Ergebnis einer in dieser Weise durchgeführten Analyse des Stieles von Lepiota procera wich um +10 % von dem einer in der üblichen Weise durchgeführten ab.

Tab. Analyse von Lepiota procera (Stiel). Formazan-Entwicklung. Werte aus je 6 Einzelbestimmungen.

Mikromethode	15,9 % Glucosamin-anhydrid
Übliche Methode	14,3

III. Die präparative Herstellung von Glucosamin- und Galaktosamin-hydrochlorid

1. Darstellung von gereinigtem Chitin und Glucosamin-hydrochlorid

Chitin aus Garnelenschalen wurde durch mehrfache Extraktion mit kaltem und heißem Wasser, kalter 1n Salzsäure und heißer 2n Natronlauge, sowie durch Auskochen mit o,2n Essigsäure gereinigt.

5,o g des gereinigten Chitins wurden durch 2-4 Min. dauerndes Erwärmen in 55 ml konz. Salzsäure (12n) gelöst. Nach Verdünnen mit 45 ml Wasser wurde die Lösung 4 Stdn. auf 1oo° erhitzt. Das hellbraune Hydrolysat wird mit wenig Aktivkohle entfärbt und im Wasserstrahl-Vacuum zur Trockene gedampft. Nach Aufnahme des Rückstandes in etwa 15 ml Wasser wird mit Aceton farbloses und kristallines Glucosamin-chlorhydrat gefällt.
Ausbeute: 4,7 g = 88 % der Theorie.

2. Darstellung von Galaktosamin-hydrochlorid

1oo g Trachealknorpel vom Rind wurden mit 5oo ml Wasser im Starmix homogenisiert und nach Zugabe von 5oo ml 4 % iger Natronlauge in der Kälte die Chondroitinschwefelsäure in 2 Stdn. extrahiert. Aus der abzentrifugierten und mit 2n Essigsäure neutralisierten Lösung wird mit 3 Vol. Alkohol die Chondroitinschwefelsäure gefällt. Sie wird mit Alkohol gewaschen und bei 6o° getrocknet. Ausbeute: 15 g.

1o g Chondroitinschwefelsäure werden in 4 Stdn. mit 2o ml 7n Salzsäure bei 1oo° hydrolysiert. Aus dem mit Aktivkohle behandelten Hydrolysat wird durch Zugabe von absolutem Alkohol unreines Galaktosamin-hydrochlorid fraktioniert gefällt. Nach 5 maligem Umkristallisieren aus 8o % igem Äthanol wurde sich chromatographisch einheitlich verhaltendes, in farblosen Nadeln kristallisierendes Galaktosamin-hydrochlorid erhalten.
Ausbeute: 8oo mg.

IV. Die Ausführung der Reaktion nach Elson und Morgan

Die Reaktion nach Elson und Morgan wurde genau nach der von Tracey (2o) angegebenen und modifizierten Vorschrift ausgeführt.

C. Zur Chromatographie

I. Analysen- und Vergleichslösung

Vor der eigentlichen Analyse bestimmt man die Summe der reduzierenden Zucker durch Titration (z.B. nach Lehmann-Maquenne-Schoorl). Die Identifizierung der Komponenten erfolgt durch eine qualitative Chromatographie. Diese erlaubt gleichzeitig eine grobe Schätzung der Mengenverhältnisse. Zur Erkennung auch der in geringer Menge vorhandenen Zucker reicht es aus, wenn man maximal auf einen Startstrich eine dem cuprometrisch ermittelten Reduktionswert von 400 µg entsprechende Menge Flüssigkeit aufträgt. Da 2 µg Monosaccharid noch deutlich nachzuweisen sind, kann somit eine Zuckerkomponente nur dann übersehen werden, wenn ihr Anteil weniger als 0,5 % des Reduktionswertes ausmacht.

Die in der Analysenlösung vorhandenen Saccharide werden zur Herstellung der Vergleichslösung in den Verhältnissen eingewogen, wie sie durch die qualitative Chromatographie geschätzt wurden. Bei großen Genauigkeitsansprüchen müssen Analysen- und Vergleichslösung einander weitgehend angeglichen werden.

II. Die Entwicklung der Chromatogramme

Zur Chromatographie wird Whatman-Papier Nr. 1 verwendet. Auf die senkrecht zur Richtung der Papierfaser verlaufenden Startstriche von 2 cm Länge werden mit der Mikropipette (5-2o µl) soviele µl (1o-2oo) von Analysen- und Vergleichslösung aufgetragen, daß sich 5-5o µg jeder Zuckerkomponente pro Startstrich befindet (5).

Chromatogramme mit 4-12 Trennbahnen für Analyse und Vergleich (Abstufung im Verhältnis 1 : 2) liefern für die meisten Zwecke hinreichend genaue Werte (mittl. Fehler: ± 2-5 %).

1. Trennung der neutralen Monosaccharide

Als Verteilungsflüssigkeit verwendeten wir das homogene Gemisch Pyridin-Essigester-Wasser 11:4o:6 (v/v). Die Durchlaufchromatographie erfolgt 24 Stdn. lang absteigend bei 2o° im Lösungsmittelgesättigten Kasten. Voneinander getrennt und bestimmt werden können die Monosaccharide: Galaktose, Glucose, Mannose / Fructose,

Arabinose, Xylose / Fucose, Ribose und Rhamnose (nach ansteigenden R_F - Werten geordnet). Fructose trennt sich dabei nicht von der Mannose, kann aber durch Ketosereaktion auf dem Papier, ohne daß die Mannose stört, nachgewiesen werden (4) (z.B. mit Reagenz aus 300 mg Anthron, 10 ml Eisessig, 20 ml Äthanol, 3 ml Phosphorsäure und 1 ml Wasser besprühen und 5-6 Min. auf 105° erhitzen. Nachweisgrenze: 2 µg / 4 cm^2 (62)). Fucose und Xylose können in 48 Stdn. durch das homogene Gemisch n-Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:1 (v/v) voneinander getrennt werden.

2. Trennung der Uronsäuren

Die Uronsäuren werden in 48 Stdn. durch das homogene Gemisch Pyridin-Essigester-Wasser-Eisessig 5:5:3:1 (v/v) voneinander getrennt. Flüssigkeit im Kastenboden zur Dampfsättigung: Pyridin-Essigester-Wasser 11:40:6 (v/v). Nach steigenden R_F - Werten geordnet: Galakturonsäure, Glucuronsäure, Mannuron- / Guluronsäure. Vor der Chromatographie werden durch tropfenweise Zugabe von 1/10 n Natronlauge bis zum Stehenbleiben der roten Phenolphthalein-Farbe die Laktone in die Salze der Säuren verwandelt (F.G. Fischer und H. Dörfel (63a)).

3. Trennung der Hexosamine

a. "Langlauf-Entwicklung"

Trennflüssigkeit: Pyridin-Essigester-Wasser-Eisessig 5:5:3:1 (v/v). Flüssigkeit im Kastenboden zur Dampfsättigung: Pyridin-Essigester-Wasser 11:40:6 (v/v). Durch den Zusatz von Eisessig zum Verteilungsgemisch wird ein Freiwerden von Hexosaminbase durch das Pyridin während der Entwicklung verhindert und eine damit verbundene Verzerrung der Hexosamin-Flecke vermieden. Nach 48 Stdn. ist Galaktosamin z.B. 15 cm, Glucosamin 18 cm weit gewandert, wenn die Flüssigkeit im Kastenboden frisch eingefüllt war. Ist sie jedoch länger im Gebrauch (und daher reicher an Pyridin und ärmer an Essigester), so wandern die Hexosamine schneller. Nach 2 wöchentlicher Kastenbenutzung genügte z.B. eine 24 stdg. Laufzeit, um gleiche Trennungen zu erhalten.

b. "Kurzlauf-Entwicklung"

Ist nur ein Hexosamin vorhanden, oder soll die Summe beider Hexosamine bestimmt werden, dann genügt eine Entwicklungsdauer mit der gleichen Trennflüssigkeit von 3-4 Stdn. Die Hexosamine wandern nur 2-3 cm weit, bleiben als scharf umrissene Flecken eng zusammen. Di-, Trisaccharide, Diuronide und Uronsäuren, die mit den Hexosaminen interferieren könnten, werden unter den Bedingungen der Hydrolyse (4 Stdn. mit 7n HCl bei 100°) völlig gespalten bzw. zerstört (untersucht durch Chromatographie der Hydrolysate von Lichenholz, Dalienwurzel, Braunalgen und Trachea knorpel als Polysaccharid-, Polyuronsäure- und Polyuronid-haltig Substanzen). Glucose wandert etwa 5-6 cm weit.

Eine solche "Kurzstrecken-Chromatographie" kann auch mit dem Gemisch Pyridin-Essigester-Wasser-Eisessig 11:30:6:1 (v/v) durch 2o stdg. Laufzeit ausgeführt werden.

c. Streuung der Extinktionswerte und Empfindlichkeit der Methode

Gestaffelte Mengen der Hexosamin-hydrochloride wurden auf je 4 Startstriche aufgetragen. Nach Chromatographie, Anfärben mit Triphenyltetrazoliumbase und quantitativer Auswertung wird die Streuung der Einzelbestimmungen berechnet.

Tab. 11 Streuungen der korr. Extinktionswerte in %, aus je 4 Einzelbestimmungen errechnet.

Belastung	"Langlauf"		"Kurzlauf"	
in γg	max.	mittl.	max.	mittl.
2,5	-	-	4,2	2,3
5,o	5,o	3,o	o,9	o,7
1o,o	3,8	2,6	o,3	o,1
2o,o	1,6	1,o	1,o	o,7

Die Fehlergrenzen der "Langlauf-Chromatographie" dürften bei Auftragen von 1o-2o γg Aminozucker auf die Startstriche und Verwendung von je 4 Trennbahnen für Analyse und Vergleich mit 1-3 %, die der "Kurzlauf-Chromatographie" bei Belastung mit 5-2o γg mit etwa 1 % zu veranschlagen sein.

Die Kleinheit und Begrenzungsschärfe der Flecken nach der kurzen Laufstrecke ermöglicht das Ausschneiden kleiner, genau

gleicher Papierflächen (1,5-2 cm^2) und bewirkt, daß noch 2,5 γ Aminozucker für viele Zwecke hinreichend genau bestimmt werden können.

d. Gepuffertes Phenol als Verteilungsflüssigkeit

Eine Trennung der Hexosamine voneinander kann auch mit Phenol von p_H 1 als Trennflüssigkeit erreicht werden (nach McFarren (64)). In solchen Chromatogrammen befindet sich bei gleichzeitiger Anwesenheit von Aminosäuren das Glucosamin zwischen Cystin und Asparaginsäure / Lysin (nach 2o Stdn. bei 2o° etwa 4 cm weit gewandert), Galaktosamin jedoch zusammen mit den beiden letztgenannten Säuren auf dem gleichen Fleck. Deshalb ist eine quantitative Galaktosamin-Bestimmung aus Hydrolysaten proteinhaltiger Stoffe mit der Ninhydrin-Reaktion nicht möglich. Die Formazan-Reaktion scheidet aus infolge der Phenolreste im Papier.

III. Anfärben der Chromatogramme

Das Verteilungsgemisch wird nach erfolgter Entwicklung im Luftstrom entfernt. Zur Vertreibung der letzten Spuren ist es notwendig, die Chromatogramme 2 Stdn. im 4o° warmen Luftstrom zu erhitzen.

Zur Sichtbarmachung der neutralen Monosaccharide sowie der Uronsäuren zieht man die Chromatogramme durch eine 2 %ige Lösung von Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) in o,5 n natronalkalischem Methanol. Im Luftstrom verflüchtigt sich in wenigen Minuten das Lösungsmittel. Die Reduktion zum roten Formazan erfolgt in 3o Min. bei einer konstanten Temperatur von 7o° in einem mit Hilfe eines Ultrathermostaten geheizten, wasserdampfgesättigten Kastens (5).

Zur Sichtbarmachung der Hexosamine eignet sich neben der Reduktion von Triphenyltetrazoliumbase zum roten Formazan auch die Reaktion der Aminozucker mit Ninhydrin (4, 7).

Die Chromatogramme werden mit einer o,2 %igen Ninhydrinlösung in mit Puffer aus gleichen Teilen In Natronlauge und 2n Essigsäure gesättigten Butanol getränkt und bei etwa 3o° im Luftstrom getrocknet. Die Ninhydrinfärbung entsteht durch 25 Min. dauerndes Erhitzen auf 6o° im temperaturkonstanten Heizkasten. Der Ninhydrinfarbstoff wird durch Besprühen mit einer salpetersauren alkoholischen Kupfernitratlösung in einen Kupferkomplex überführt, der mit genau 5 ml Methanol aus dem Papier eluiert wird (2 ml gesättigte wässrige Kupfernitratlösung, o,4 ml 1o %ige Salpetersäure, 1o ml 96 %iges Äthanol).

Zum Vergleich der beiden Anfärbemethoden wurden gestaffelte Mengen der Aminozucker auf die Startstriche (je 4) aufgetragen. Nach der Chromatographie wurde sowohl mit Ninhydrin, als auch mit TTC angefärbt und nach quantitativer Auswertung die Streuungen der Einzelbestimmungen berechnet.

Tab. 22

	Anfärben mit TTC			Anfärben mit Ninhydrin		
Belastung: Glucosamin	Streuungen % max.	mittl.	Extinktion (korr)	Streuungen % max.	mittl.	Extinktion (korr)
5 µg	5,o	3,3	161 · $1o^{-3}$	6,o	3,2	66 · $1o^{-3}$
1o "	3,8	2,3	333 · $1o^{-3}$	6,2	3,9	129 · $1o^{-3}$
2o "	1,4	1,4	642 · $1o^{-3}$	3,5	3,3	26o · $1o^{-3}$
Belastung: Galaktosamin						
5 µg	3,9	2,7	14o · $1o^{-3}$	15,o	1o,ρ	51 · $1o^{-3}$
1o "	3,5	3,o	3o8 · $1o^{-3}$	3,5	2,4	1o5 · $1o^{-3}$
2o "	1,6	o,6	61o · $1o^{-3}$	4,9	4,2	195 · $1o^{-3}$

Die Extinktionen des von gleichen Hexosamin-Mengen gebildeten Formazans sind etwa 2-2½ mal größer als die des Cu-Salzes des Ninhydrinfarbstoffes. Der Anstieg der Extinktionen bei steigenden Hexosamin-Mengen beträgt bei der Ninhydrinreaktion vom Glucosamin nur 4o %, vom Galaktosamin nur 33 % von dem der Formazanbildung. Die mittleren Streuungen der TTC-Anfärbung betragen 1-3 %, der Ninhydrin-Anfärbung 2-4 %.

Nach der "Langlauf-Entwicklung" kommen die Hexosamine in die breite aminosäurefreie Lücke zwischen dem schneller wandernden Valin und den langsamer wandernden Alanin, Threonin, Prolin zu liegen. Dagegen überlagern nach der "Kurzstrecken-Entwicklung" die angeführten Aminosäuren die Hexosamine. In Gegenwart von Aminosäuren darf deshalb nur ein durch "Langstrecken-Entwicklung" erhaltenes Chromatogramm mit Ninhydrin angefärbt werden.

Nach quantitativer Auswertung von Hydrolysaten proteinfreier Chitin-haltiger Präparate (gereinigtes Chitin oder Skelettsubst. von Pilzen) werden durch beide Anfärbeverfahren gleiche Glucosaminwerte erhalten. Nach Untersuchung von Hydrolysaten protein - haltiger Chitin-Präparate (Pilzsubstanzen) stellten wir dagegen größere Unterschiede zwischen den Ergebnissen fest.

Tab. 23 **Nach Anfärben mit Ninhydrin (a), nach Anfärben mit TTC (b) bestimmtes Glucosamin-anhydrid (Angaben in % der Einwaage).**

	a	b	Differenz in %
Clavaria pistillaris (Skelettsubst.)	27,2	27,8	+2,1
Lepiota procera (Skelettsubst.)	44,9	45,6	+1,8
gereinigtes Chitin	71,o	71,6	+o,9
Boletus edulis (Gesamtpilz)	4,3	4,1	+4,5
Lepiota procera (Gesamtpilz)	6,7	5,2	+28,8

Wir erklären die Unterschiede damit, daß unter den Hydrolysenbedingungen Peptide bestehen bleiben, die den Glucosamin-Fleck überlagern und somit nach Anfärben mit Ninhydrin zu hohe Werte erhalten werden.

Die Formazan-Bildung durch die Hexosamine wird untersucht bei konst.Temperatur (7o°) und verschiedener Erhitzungsdauer, sowie bei konst. Erhitzungsdauer (2o Min.) und verschiedener Temperatur. Die korr. Extinktionswerte von Galaktosamin und Glucose werden auf die des Glucosamins bezogen. Die Bezugswerte geben an, wieviel % die Reduktionswerte vom Galaktosamin-hydrochlorid bzw. Glucose-hydrat von denen des Glucosamin-hydrochlorids ausmachen.

Tab. 24 Formazan-Bildung auf 4 cm^2 großen Quadraten belastet mit $1o^{-7}$ Mol Glucosamin-hydrochlorid, Galaktosamin-hydrochlorid bzw. Glucosehydrat unter den Bedingungen: a.verschiedene Erhitzungsdauer bei 7o°, b.verschiedene Temperaturen 2o Min. lang.

	Extinktion · $1o^{-3}$				Bezugswerte in %	
	Glucosamin·HCl	Galaktosamin·HCl	Glucosehydrat	Leerwert	Galaktosamin·HCl	Glucosehydrat
a.Min.						
15	962	918	776	234	93,8	74,4
2o	1o47	988	883	293	92,3	78,3
3o	1o31	965	957	3o8	91,o	89,7
b.°C						
65	791	755	592	157	94,4	68,6
7o	1o47	988	883	293	92,3	78,3
75	125o	1199	127o	487	91,o	1o2,6

Nach 2o Min. dauernder Farbentwicklung bei 7o° beträgt der Reduktionswert des Galaktosamins 92 % von dem des Glucosamins. Durch Änderung der Temperatur um ± 5° oder der Zeit um ± 5 Min. entstehen Abweichungen von höchstens 3 %. Falls nur Glucosamin als Bezugssubstanz zur Verfügung steht, läßt sich auch die Galaktosamin-Konzentration in der Analysenlösung mit Hilfe des hier angegebenen relativen Reduktionswertes errechnen.

Die Formazan-Bildung durch die Hexosamine ist weniger abhängig von kleinen Unterschieden der Reaktionstemperatur und -Zeit, als jene durch die neutralen Monosaccharide. Das ist dadurch begründet, daß die Hexosamine schneller als z.B. Glucose reduzieren und daß die Reduktion nach Bildung von 2 Mol Formazan sehr langsam wird.

IV. Die Auswertung der Chromatogramme

Um wenig streuende Werte zu erhalten, müssen die Formazanflecken wegen der relativ hohen Leerwerte möglichst flächengleich ausgeschnitten werden. Wir fanden die Anwendung eines Lineals oder von Schablonen aus durchsichtigem Material nützlich. Das Formazan wird genau mit 5 ml Methanol-Eisessig 1o:1, der Ninhydrin-Kupferkomplex mit genau 5 ml Methanol eluiert.

Die Extinktionen der Eluate werden bei 482 mμ (entsprechend dem Absorptionsmaximum des Formazans) bzw. bei 5o4 mμ (entsprechend dem Absorptionsmaximum des Kupferkomplexes der Ninhydrinfärbung) mit dem Beckman-Spektrophotometer DU in der 1 cm Küvette gegen das Eluiergemisch als Kompensationsflüssigkeit gemessen.

In ein Diagramm wird die gemessene Extinktion gegen die aufgetragenen µl auf Millimeterpapier eingetragen. Der Schnittpunkt der durch die Punkte gezogenen Geraden mit der Ordinate entspricht dem Leerwert, der von der gemessenen Extinktion abgezogen wird. Der Quotient aus den korr. Extinktionen der Analysen- und Vergleichslösung, multipliziert mit der bekannten Konzentration des Vergleichszuckers, ergibt die gesuchte Konzentration der betreffenden Komponente in der Analysenlösung.

D. Zur Untersuchung der Kohlenhydrate einiger Pilze

I. Die Analysensubstanzen

1. "Gesamtsubstanz"

Die Pilze wurden sofort nach dem Sammeln sauber geputzt und im Ventilatortrockenschrank bei 60° luftgetrocknet.

2. "Membransubstanz"

Zur Entfernung der lipoidlöslichen und anderen niedermolekularen Bestandteile wurde das Material nach einem Vorschlag von Kurth (65) mit dem azeotropen Gemisch Benzol-Alkohol 2:1 (v/v) 12 Stdn. im Soxleth kalt extrahiert.

Um die Wasser- und Säure-löslichen Anteile wie lösliche Saccharide und Proteine zu entfernen, behandelten wir die Substanz zweimal je 30 Min. mit der fünffachen Menge 1n Salzsäure bei 20-30° und waschen den abzentrifugierten Rückstand im Zentrifugenglas mit Wasser bis zur neutralen Reaktion. Die erhaltene "Membransubstanz" wurde mit Aceton gewaschen und bei 60° im Trockenschrank getrocknet.

3. "Skelettsubstanz"

Durch zweimaliges je 15 Min. dauerndes Aufkochen der "Membransubstanz" mit der 20 fachen Menge 2n Kalilauge gehen die meisten der noch verbliebenen organischen Bestandteile in Lösung. Zurück bleibt mit laugeunlöslichen Hexosanen vergesellschaftetes Chitin bzw. Zellulose. Der "Skelettsubstanz" genannte Rückstand wird bis zur neutralen Reaktion mit Wasser gewaschen, mit Aceton behandelt und bei 60° getrocknet.

Die Präparate wurden in dicht verschließbaren Flaschen aufbewahrt und von Zeit zu Zeit ihr Feuchtigkeitsgehalt durch Trocknen im Hochvacuum über Phosphorpentoxyd bestimmt. Die Einwaagen zur Analyse wurden nachträglich auf getrocknete Substanz umgerechnet. Den Aschegehalt bestimmten wir durch Veraschen der Substanz bei 900°.

II. Die Analyse der Pilzsubstanzen

Die einzelnen Arbeitsgänge (Hydrolyse, Aufarbeitung, Chromatographie) führten wir wie bereits beschrieben durch. Zur Hydro-

lyse der unvorbehandelten Pilzsubstanz mit überkonz. Salzsäure wurden 5oo-7oo mg, der "Membran-" und "Skelett-Substanzen" 2oo-3oo mg eingewogen. Die Einwaagen zur Hydrolyse mit konz.Schwefelsäure waren etwa 2oo mg. Die meisten Analysen wurden nach der Hydrolysen-Methode mit konz. Schwefelsäure ausgeführt, da diese einfacher und schneller als die mit überkonz. Salzsäure ist. Das Chitin wurde aus Einwaagen von 5o-15[illegible] mg bestimmt durch Spaltung mit 7n Salzsäure in der Hitze. Die Säuren entfernten wir aus den Hydrolysaten mit Silber- bzw. Calziumkarbonat, nur die der Gesamt-, Membran- und Skelettsubstanzen der Pilze Penicillium chrysogenum und Streptomyces griseus wurden mit Hilfe einer Anionenaustauscher-Säule (Lewatit MI 15o) entsäuert.

Literaturverzeichnis

1. R.Whistler, Polysaccharide Chemistry, Academic Press Inc. New York 1949
2. Klein, Handbuch der Pflanzenanalyse (1932) 3 (2) 4, 72, 121
3. K.Nabel, Arch. Mikrobiol. 10 515 (1939)
4. R.I.Block, Paper Chromatography, Academic Press Inc. New York 1955.
5. F.C.Fischer u.H.Dörfel, Z.physiol.Chem. 297 164 (1954)
6. E.Hägglund, Chemistry of Wood, Academic Press Inc. New York 1951
7. E.Heuser, Cellulose Chemistry, Academic Press Inc. New York 1947
8. H.Braconnot, A.ch. 12 172 (1819)
9. R.Willstätter u.L.Zechmeister, Ber. 46 2401 (1913)
   Ber. 52 722 (1919)
   Ber. 57 854 (1931)
10. H.Ost, Ber. 46 2995 (1913)
11. O.Ant-Wuorinen, Die Chem.Technik (1942) 555
12. A.Wohl, Ber. 23 2056 (1890), Cell. 2 1 (1921)
13. H.H.Schlubach, Z.angew.Chem. 45 245 (1932), ebenda 47 132 (1934), Ann. 547 78 (1941)
14. L.Zechmeister, Z.physiol.Chem. 103 316 (1919)
15. Y.Kauko, Naturwiss. 9 237 (1921)
16. H.Frahm, Ber. 74 622 (1941)
17. Z.I.Kertesz, The Pectic Substances, Interscience Publ. New York 1951
18. L.Zechmeister u.G.Toth, Ber. 64 2028 (1931), Ber. 65 161 (1932), Fortschr.Chem.org.Naturstoffe 2 212 (1939)
19. G.Ledderhose, Ber. 9 1200 (1876)
20. K.Paech u.M.V.Tracey, Moderne Methoden der Pflanzenanalyse Bd.II, S. 268, Springer Verlag
21. L.A.Elson u.W.T.I.Morgan, Biochem.J. 27 1824 (1933)
22. I.W.Palmer et al., J.biol.Chem. 119 491 (1937)
    L.F.Hewitt, Biochem.J. 32 1554 (1938)
23. R.Boyer et al., Biochem.Z. 282 242 (1935);
    H.N.Horowitz et al., Arch.Biochem. 25 226 (1950)
24. C.P.Sideris et al., J.biol.Chem. 126 233 (1938)
25. A.Bendich u.E.Chargaff, J.biol.Chem. 166 283 (1946)

26. D.Amidoff, W.T.I.Morgan u. W.M.Watkins, Biochem.J. 51 379 (1952)

27. N.F.Boas, J.biol.Chem. 204 553 (1953)

28. I.Immers u.E.Vasseur, Nature 165 898 (1950), Acta chem.Scand. 6 363 (1952).

29. E.F.Annison, A.T.James u.W.T.I.Morgan, Biochem.J. 48 477 (1951)

30. S.Gardell, Acta chem.Scand. 7 207 (1953)

31. C.I.M.Rondle u. W.T.I.Morgan, Proc.of the Biochem.Soc. 155 (Biochem.J. 59 Februar Heft XIII)

32. H.Masamune, Z.Yoshizawa u.M.Maki, Tohoku J.Exptl.Med. 53 237 (1951), C.A. 1951 9567; H.Masamune u.M.Maki, Tohoku J. Exptl.Med. 55 299 (1952), C.A. 1953 11303; H.Masamune u. Z.Yoshizawa, Tohoku J.Exptl. Med. 59 1 (1953), C.A. 1954 7076. Siehe auch: D.M.Waldron, Nature 170 461 (1952); L.I.Woolf, Nature 171 841 (1953)

33. A.W.Dox u.R.E.Niedrig, J.biol.Chem. 9 267 (1911), ebenda 18 167 (1914), ebenda 19 235 (1914)

34. H.I.Birkinshaw et al., Trans.Roy.Soc.London B 220 331 (1931)

35. O.E.May u.E.G.Ward, Biochem.J. 27 318 (1933)

36. I.V.Albericci, Biochem.J. 37 243 (1943)

37. Errera, Compt.rend. 101 253, 391 (1885)

38. J.Zellner, Chemie der höheren Pilze, W.Engelmann Verlag Leipzig 1907

39. D.R.Ergle, J.Am.Chem.Soc. 69 2061 (1947)

40. R.Bourquelot, Bull.de la Société mycologique de France VII 155 (1891)

41. E.Cramer, Arch.Hyg. 20 197 (1894)

42. J.W.Foster, Chemical Activities of Fungi, Academic Press Inc. New York 1949

43. T.Chrzaszcz u.D.Tiukow, Biochem.Z. 207 39 (1929)

44. T.Hida, J.Shanghai Sci.Inst. 1 85 (1934)

45. A.Voswinkel, C. 1891 II 766, siehe auch E.Schulze, Ber. 24 2277 (1891)

46. A.Ulander u.B.Tollens, Ber. 39 407 (1906)

47. P.W.Clutterbuck et al., J.Soc.Chem.Ind. 55 T (1936), Biochem.J. 28 94 (1934)

48. W.N.Haworth et al., Biochem.J. 29 612 (1935), ebenda 31 640 (1937)

49. W.N.Haworth et al., J.chem.Soc. 833 (1941)

50. E.Winterstein, Ber.deut.botan.Ges. 11 441 (1893), Z.physiol.Chem. 19 521 (1894), Ber. 27 3113 (1894), Ber. 28 167 und 774 (1895)

51. E.Gilson, Ber. 28 821 (1895)

52. E.Scholl, Monatsh. 29 1023 (1908)
53. N.I.Proskuriakow, Biochem.Z. 167 68 (1926)
54. G.Behr, Arch.Mikrobiol. 1 418 (1930)
55. A.G.Normann u.W.H.Peterson, Biochem.J. 26 1946 (1932)
56. M.Schmidt, Arch.Mikrobiol. 7 241 (1936)
57. R.Garzuly-Janke, Zentr.Bakt.Parasitenk. Abt.II 102 361 (1940)
58. F.von Wettstein, Sitzungsber.Akad.d.Wiss.Wien Math.naturw.Kl.Abtl.1 130 1 (1921)
59. W.R.Smithies, Biochem.J. 51 259 (1952)
60. N.Porges, Botan.Gaz. 94 197 (1932)
G.Schulz, Planta 27 196 (1937)
61. Klein, Handbuch der Pflanzenanalyse (1932) 1 (2) 786
62. R.Johanson, Nature 172 956 (1953)
63. a. F.G.Fischer u.H.Dörfel, Z.physiol.Chem. 301 224 (1955)
b. F.G.Fischer u.H.Dörfel, Biochem.Z. 324 544 (1953)
64. E.F.McFarren, Analyt.Chem. 23 168 (1951)
65. E.F.Kurth, Ind.Eng.Chem.,Anal.Ed. 11 203 (1939)

Lebenslauf

Ich, Hans-Joachim N e b e l, wurde am 27. Januar 1930 als Sohn des Kaufmannes Fritz N e b e l und seiner Ehefrau Martha geb. Laue in Leipzig geboren.

Von 1936-1940 besuchte ich die Volksschule und ab Frühjahr 1940 die Oberschule (staatliche Friedrich Nietzsche- spätere Günther Prien Schule) in Leipzig.

Durch einen Luftangriff auf Leipzig im Februar 1944 verloren meine Eltern ihren gesamten Besitz und übersiedelten aus beruflichen Gründen kurz vor der deutschen Kapitulation nach Haßfurt a/Main. Dort trat ich nach Kriegsende in die Oberschule ein und legte schließlich nach Absolvierung der beiden letzten Oberklassen an der Oberrealschule Schweinfurt im Juni 1949 die Reifeprüfung ab.

Mein Chemiestudium begann mit dem Wintersemester 1949/50 an der Universität Würzburg. Im Mai 1952 legte ich die Diplomchemiker-Vorprüfung, im Juli 1954 die Diplomchemiker-Hauptprüfung mit "sehr gut" ab. Im Wintersemester 1954/55 wurde ich wissenschaftliche Hilfskraft am Chemischen Institut der Universität Würzburg.

Ich habe mich bei noch keiner anderen Fakultät um den Doktorgrad beworben.